

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg–Essen

Aus der Forschungsabteilung  
der Klinik für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde

**Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF)  
und sein Einfluss auf Granulozyten im Tumormilieu  
bei Patienten mit Kopf- und Halstumoren**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Universität Duisburg–Essen

Vorgelegt von  
**Hossein Gholaman**  
aus Teheran

2011

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. M. Forsting  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. S. Brandau  
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Paschen  
3. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Heß, Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 12. März 2012

Ever tried. Ever failed. No matter.  
Try again. Fail again. Fail better.

*(Samuel Beckett, 1983)*

Diese Dissertation widme ich meinen Eltern Karim Gholaman und Feresthe Yazdanbakhsh, ohne deren Glauben und moralische Unterstützung ich meine beruflichen Wünsche nicht hätte verwirklichen können.

# Veröffentlichungen

## Posterpräsentationen

- International symposium on novel functions of neutrophil granulocytes in Lübeck (2009)
- 8. Forschungstag der Medizinischen Fakultät Duisburg-Essen (2009)

## Publikationen

- Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, Scherag A, Hütte J, Dominas N, Lehnerdt GF, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S. (2010): Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. Int J Cancer. [Epub ahead of print].
- Dumitru CA, Gholaman H, Trellakis S, Bruderek K, Dominas N, Gu X, Bankfalvi A, Whiteside TL, Lang S, Brandau S. (2011): Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil activation. Int J Cancer. 129, 859-869.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1. Immunologische Funktionen neutrophiler Granulozyten	7
1.1.1. Diapedese und proinflammatorische Funktion neutrophiler Granulozyten	7
1.1.2. Degranulation neutrophiler Granulozyten	8
1.1.3. Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der Tumor-Wirt-Interaktion	11
1.2. Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor	12
1.2.1. Vorkommen und Struktur von MIF	13
1.2.2. Der Bindungspartner von MIF	16
1.2.3. Immunmodulatorische Beteiligung von MIF bei Erkrankungen	17
1.2.4. Bedeutung von MIF in der Tumorphathogenese	17
<b>2. ZIELSETZUNG</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIALIEN</b>	<b>19</b>
3.1. Chemikalien	20
3.2. Puffer und Lösungen	22
3.3. Zellkulturmaterialien	23
3.4. Antikörper und Liganden	25
3.5. Kits	25
3.6. Stimulantien	25
3.7. Zelllinien	25
3.8. Andere Materialien	25
3.9. Spezielle Laborausrüstung	26
3.10. Patientenmaterial	27
<b>4. METHODEN</b>	<b>28</b>
4.1. Zellkulturtechniken	28
4.1.1. Zellkultur etablierter Zelllinien (FaDu)	28
4.1.1.1. Kultur und Passage von Zellen	28
4.1.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
4.1.1.3. Herstellen von FaDu-Kulturüberstand	28
4.1.1.4. Zellzahlbestimmung mit dem CASY-Counter	29
4.1.2. Isolation neutrophiler Granulozyten aus dem Vollblut	29
4.2. Zytometrische Techniken	29
4.2.1. Durchflusszytometrie	29

4.2.1.1.	Markierung intrazellulärer Moleküle	30
4.2.1.2.	Nachweis apoptotischer Granulozyten	31
4.2.1.3.	Detektion reaktiver Sauerstoff-Intermediate (ROI) in Granulozyten	31
4.2.2.	Zytospins von Granulozyten	32
4.3.	Histologische Techniken	32
4.3.1.	Einfrieren von Tumorgewebe	32
4.3.2.	Herstellung von Gefrierschnitten	32
4.3.3.	Hämatoxilin/Eosin (HE)-Färbung	33
4.3.4.	Immunohistochemische Färbung	33
4.4.	Migration von Granulozyten	34
4.5.	Sandwich-ELISA für MIP-1 $\beta$	35
4.6.	Gelatine-Zymographie zur Detektion von Matrixmetalloproteasen	35
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
5.1.	MIF Expression bei Kopf- und Halstumoren	37
5.1.1.	MIF Expression im Gewebe von Patienten mit Kopf- und Halstumoren	37
5.1.2.	MIF Expression und Freisetzung durch FaDu-Tumorzellen	41
5.2.	Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf Granulozytenmigration	43
5.3.	Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf das Überleben der Granulozyten	45
5.4.	Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf Granulozytenaktivierung	46
5.4.1.	Effekte von tumoralem MIF auf Granulozytengranula	46
5.4.1.1.	Effekte von FaDu-Kulturüberstand auf Matrixmetalloprotease (MMP) in Granulozyten	46
5.4.1.2.	Effekte von MIF auf die Lactoferrin-Produktion der Granulozyten	47
5.4.1.3.	Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf reaktive Sauerstoff- Intermediate (ROI) von Granulozyten	50
5.4.2.	Effekte von FaDu-Kulturüberstand auf die Chemokinsekretion von Granulozyten	52
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>55</b>
6.1.	Diskussion der Methoden	55
6.1.1.	MIF-Blockade durch ISO-1	55
6.1.2.	Rhodamin-123 als Nachweis für reaktive Sauerstoff-Intermediate	56

6.1.3. Zymographie als Nachweismethode der Matrixmetalloprotease	57
6.2. Diskussion der Ergebnisse	60
6.2.1. Expression von MIF im malignen Gewebe	60
6.2.2. Rolle von MIF bei der Apoptose	62
6.2.3. Wirkung von tumoralem MIF auf die Funktion von Immunzellen	64
6.2.4. Die Rolle der primären Granula von Granulozyten im Tumormilieu	69
6.2.5. Klinische Relevanz der tumoralen MIF-Produktion	70
<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>Danksagung</b>	<b>88</b>

# 1. EINLEITUNG

Kopf- und Halstumore stellen mit über 650.000 Neuerkrankungen und über 350.000 Todesfällen pro Jahr weltweit die sechsthäufigste Krebsart dar. Dabei bilden Plattenepithelkarzinome, die ihren Ursprung in Mundhöhle, Rachen oder Kehlkopf haben, mit über 90% der Fälle die häufigste Gruppe aller Kopf- und Halstumore (Argiris et al., 2008).

Im Verlauf von Tumorgenese und -progression findet eine intensive Interaktion von tumoralen Faktoren und Komponenten des körpereigenen Immunsystems statt, dies ist auch bei Patienten mit Kopf-Halstumoren zu beobachten. Eine mögliche Ursache dafür ist die Tatsache, dass Tumorzellen durch Ausschüttung verschiedenster Faktoren ein chronisch-entzündliches Milieu generieren, welches die Funktion von Leukozyten so modifiziert, dass diese ihrerseits das Tumorwachstum begünstigen können (Lin and Karin, 2007). Dies trifft beispielsweise auf regulatorische T-Zellen (Tregs), Suppressorzellen myeloiden Ursprungs (MDSC), tumorassoziierte Makrophagen (TAM) und tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) zu. In diesem Zusammenhang ist die Interaktion zwischen Tumorzellen und neutrophilen Granulozyten noch wenig erforscht, obschon diese mit einem Anteil von 50–65% zu den häufigsten Leukozyten im peripheren Blut gehören und eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten infiltrieren. Darüber hinaus könnte durch Freisetzung bestimmter Mediatoren aus Neutrophilen eine Feedback-Reaktion mit den Tumorzellen entstehen und somit eine intensive Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und neutrophilen Granulozyten existieren (di Carlo et al., 2001).

Die molekularen Mechanismen, die der Modulierung von Immunzellen während Tumorgenese und -progression zugrunde liegen, wurden bisher nur ansatzweise aufgeklärt. Zu den bereits beschriebenen Faktoren, die eine Veränderung der Funktion von Immunzellen hervorrufen, gehören lösliche proinflammatorische Mediatoren wie Metabolite der Arachidonsäure, Zytokine und Chemokine (Coussens and Werb, 2002). Eines dieser Zytokine ist der Makrophagen-migrationsinhibierende Faktor (MIF), dem bei Entzündungsreaktionen und Tumorentstehung entscheidende regulatorische Funktionen zugeschrieben werden (Bach et al., 2008).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung modulatorischer Effekte von MIF auf die Biologie und Funktion neutrophiler Granulozyten in Kopf-Halstumoren. Zum besseren Verständnis der Rolle der neutrophilen Granulozyten wird ihre immunologische Funktion im Folgenden genauer beschrieben werden.



## 4.1. Immunologische Funktionen neutrophiler Granulozyten

### 1.1.1. Diapedese und proinflammatorische Faktoren neutrophiler Granulozyten

Granulozyten werden anhand ihrer Morphologie und Anfärbereigenschaft weiter unterteilt in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten. Sie enthalten eine große Anzahl von Lysosomen und Sekretionsvesikel (Granula). Neutrophile Granulozyten sind dabei zentrale Protagonisten des Entzündungsgeschehens und werden aufgrund ihres segmentförmigen Kerns als „polymorphkernige neutrophile Granulozyten“ (PMN) bezeichnet. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems und erkennen konservierte Strukturen von Pathogenen durch keimbahnkodierte Mustererkennungs-Rezeptoren. Die Aufgabe dieser Zellpopulation ist die Elimination von Pathogenen, Fremdpartikeln und Gewebetrümmern. Granulozyten infiltrieren als erste Immunzellen aus dem peripheren Blut in infizierte Gewebe (Smith, 1994). Sie sind durch Interaktion mit dem Endothel befähigt sich der passiven Zirkulation zu entziehen und sich extraluminal in Richtung des entsprechenden Pathogens zu bewegen, um den Erreger zu phagozytieren oder durch Sekretion mikrobizider Stoffe zu bekämpfen. Das infizierte bzw. geschädigte Gewebe schüttet zu diesem Zweck Entzündungsmediatoren aus, die eine Expression von Selektinen an der Oberfläche von angrenzenden Endothelzellen induzieren. So können Granulozyten eine schwache Bindung mit Endothelzellen eingehen und hierbei an diesen entlangrollen (Moore et al., 1995). Eine weitere wichtige Gruppe leukozyitärer Adhäsionsmoleküle sind die Integrine, von denen CD11a/CD18- und CD11b/CD18-Integrine die neutrophilen Hauptintegrine darstellen. Während CD11a/CD18 vorwiegend mit dem endothelialen Adhäsionsmolekül ICAM-1 interagiert, hat CD11b/CD18 neben ICAM-1 noch andere Liganden wie den Gerinnungsfaktor X, Matrix-Proteine, Komplementfaktoren und die neutrophilen Proteine Myeloperoxidase und Elastase (Mocsai et al. 1999). Die parazelluläre Migration erfolgt schließlich über die Moleküle ICAM-1 und PECAM-1. Diese Art der Migration wird Diapedese genannt und ermöglicht Granulozyten zwischen Endothelzellen hindurch ins Gewebe zu gelangen.

Lange Zeit galt die Phagozytose von Erregern als einzige Funktion neutrophiler Granulozyten. In den letzten Jahren jedoch wurden Neutrophile zunehmend als zytokinproduzierende Zellen wahrgenommen, wodurch ihre Rolle im Zytokinnetzwerk an Bedeutung gewann. Es konnte gezeigt werden, dass dabei die Sekretion von proinflammatorischen Faktoren wie IL-8, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  eine wichtige Rolle spielt (Altstaedt et al., 1996; von der Ohe et al., 2001). Die während der Entzündungsreaktion von Granulozyten synthetisierten Zytokine und Chemokine scheinen durch Mobilisierung und

Regulierung anderer Effektorzellen wie Makrophagen, T-Zellen und der Neutrophilen selbst von großer Bedeutung zu sein (Theilgaard-Mönch et al., 2006).

Die biologische Bedeutung der Chemokine geht jedoch über ihre Rolle als chemische Lockstoffe hinaus. So wurde gezeigt, dass sie in vielen anderen biologischen Prozessen einschließlich T-Zell-Aktivierung, Wachstumsregulierung und Angiogenese involviert sind (Hasegawa et al., 2001; Horuk, 2001). Viele pathologische Veränderungen konnten in der Vergangenheit mit einer Dysregulation des Chemokinnetzwerkes in Verbindung gebracht werden. Beim Menschen sind eine Vielzahl entzündlicher Erkrankungen, insbesondere Autoimmunerkrankungen, auf eine lokale Akkumulation von infiltrierenden Leukozyten zurückzuführen, auf deren Oberfläche proinflammatorische Chemokinrezeptoren angereichert sind. Bei entzündlichen Nierenerkrankungen konnte eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Expression des Chemokinrezeptors CCR5, an dem MIP-1 $\beta$  bindet, hergestellt werden (Seegerer et al., 2000). Im nasal-respiratorischen Sekret von Patienten mit akuter und chronischer Rhinosinusitis konnte außerdem eine deutlich erhöhte Konzentration von MIP-1 $\beta$  gefunden werden (Riechelmann et al., 2005). MIP-1 $\beta$  scheint also besonders bei der granulozytären Inflamationsreaktion im entzündlichen Gewebe von Bedeutung zu sein.

Im Anschluss an die Chemokinausschüttung initiieren aktivierte Neutrophile ein apoptotisches Programm. Durch diesen programmierten Zelltod wird einerseits die Auflösung von Entzündungen erleichtert und andererseits die Gewebeschädigung der extrazellulären Umgebung durch überschießende Freisetzung von zytotoxischen Effektor-Proteinen und reaktiven Sauerstoffspezies verhindert. Somit kann das Gewebe vor nekrotischer Zell-Lyse geschützt werden.

### 1.1.2. Degranulation neutrophiler Granulozyten

Eine weitere Funktion neutrophiler Granulozyten ist die Degranulation. Diese geht der Chemo- und Zytokinausschüttung voraus und stellt einen entscheidenden Schritt bei der Bekämpfung von Mikroorganismen dar. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage mit Hilfe ihrer zytotoxischen Substanzen phagozytierte intrazelluläre Pathogene unschädlich zu machen. Außerdem sind Neutrophile befähigt diese Substanzen im Rahmen der Exozytose in den Extrazellularraum abzugeben. Diese granulozytären Substanzen sind im Zytosol innerhalb geschlossener Kompartimente lokalisiert. Diese Kompartimente werden sekretorische Vesikel oder Granula genannt. Die Funktionen der Granula sind sehr vielfältig, sie reichen von der Aktivierung des Granulozyten bis zur Zerstörung von Mikroben. Kommt es jedoch zu einer persistierenden Entzündung mit überschießender Ausschüttung der

Granula, kann allerdings umliegendes gesundes Gewebe und extrazelluläre Matrix zerstört werden. (Weiss, 1989). Ein weiterer Bestandteil der Granula sind Membranproteine wie CD11b/CD18. CD11b/CD18 wird während der Exozytose in die Zellmembran integriert und ermöglicht eine Interaktionen des Neutrophilen mit benachbarten Strukturen (Borregaard, 1997). Weiterhin sind Neutrophile befähigt durch Freisetzung einer fibrillären Matrix aus Chromatin und Granula-Proteinen Bakterien zu binden. Diese Netze werden Neutrophil Extracellular Traps (NETs) genannt und verhindern die weitere Verbreitung festgesetzter Bakterien. Am Ort ihres Einsatzes müssen die Granula nicht erst vom Granulozyten *de novo* synthetisiert werden, da sie bereits während der Granulozyten-Differenzierung gebildet und gespeichert wurden und so *ad hoc* freigesetzt werden können. Basierend auf dem Zeitpunkt ihrer Reifung und Freisetzung unterscheidet man drei Klassen von Granula: tertiäre, sekundäre und primäre Granula.

Zur Bekämpfung mikrobizider Bestandteile bedient sich der Granulozyt zweier Strategien: einer nicht-oxidativen und einer oxidativen (Ganz, 1999). Bei dem nicht oxidativen Weg werden zuerst aus tertiären Granula Gelatinasen mobilisiert, welches den Granulozyten die Diapedese ermöglicht. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Gelatinase, ähnlich den Kollagenasen, als matrixdegradierende Enzyme Kollagen aus Basalmembranen und Bindegewebe zersetzen können. Durch Exozytose der Granula werden Adhäsionsmoleküle in die Plasmamembran eingebaut, so dass eine permanente und schnelle Zelladhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Endothel erfolgen kann und eine Penetration durch dessen Basalmembran ermöglicht wird (Murav'ev et al., 2003). Zu den Proteasen, die der Penetration der Basalmembran dienen, zählen Matrixmetalloproteasen (MMPs), die von Granulozyten, aber auch von Tumoren synthetisiert werden können und somit nicht nur bei der Wanderung von Immunzellen, sondern auch bei der Pathogenese und Metastasierung invasiver Tumore eine entscheidende Rolle spielen. MMPs stellen eine Familie von mindestens 26 zink- oder kalziumabhängigen Hydrolasen dar, die sich in ihrer Substratspezifität und ihrem Molekulargewicht unterscheiden. Es ist nachgewiesen, dass das Expressionsniveau von MMP-9 und MMP-2 in Melanomzellen mit deren metastatischem Potential positiv assoziiert ist. Dabei scheint die Balance zwischen den aktivierten Matrixmetallproteasen und seinen freien Gewebeinhibitoren (TIMPs) für die Tumorprogression von entscheidender Bedeutung zu sein. Dementsprechend ging die Überexpression von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 mit einer Hemmung der malignen Invasion von Melanomzellen einher (Hofmann et al., 2003). MMP-9, auch Gelatinase B genannt, ist eine Gelatinase höheren Molekulargewichts. In ihrer inaktiven Form weist sie 92 kDa auf, in ihrer aktiven Form 86 kDa. MMP-9 wird von

Tumorzellen, Endothelzellen, sowie von Epithel- und Entzündungszellen ausgeschüttet. Sie degradiert neben Kollagenen vom Typ II, IV und V unter anderem auch Gelatine, Galektin-3 und Elastin.

Ein weiteres Molekül der nicht oxidativen Abwehr neutrophiler Granulozyten ist Lactoferrin. Es ist ein eisenbindendes Glykoprotein, das eine bedeutsame Rolle bei der Vermittlung von angeborener und erworbener Immunität spielt. Es wird in sekundären, auch spezifisch genannten, Granula neutrophiler Granulozyten gespeichert und auf Aktivierung hin sezerniert. Diese Lactoferrin enthaltenden Vesikel besitzen im Vergleich zu den anderen Granula eine deutlich größere und irregulärere Oberfläche (Borregaard und Cowland, 1997). Die Rekrutierung dieser Granula erfolgt langsamer als die der Gelatinase-Vesikel, jedoch schneller als die der primären Granula. Zytokine, welche von verletzten, infizierten oder entarteten Zellen ausgeschüttet werden, wirken stimulierend auf die Degranulation von Neutrophilen und damit auf die Freisetzung von Lactoferrin (Kruzel et al., 2007). Lactoferrin wirkt bakterizid, indem es Eisen bindet und es so dem Bakterienstoffwechsel entzieht. Dieser Vorgang geht jedoch mit Membranschäden und konsekutiver Lyse des Granulozyten, der Zielzelle und des umliegenden Gewebes einher (Chapple et al., 1998). Lactoferrin kann sich protektiv auf Krebsentstehung, Tumorwachstum und Metastasierung auswirken (Ward et al., 2005). Weiterhin ist Lactoferrin in der Lage, die intrazelluläre Konzentration von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten (ROI) zu reduzieren. Hierbei fungiert Lactoferrin als Antioxidans, da es Eisen durch Komplexbildung an der Katalyse der  $\text{H}_2\text{O}_2$ - und  $\text{OH}^-$ -Bildung hindert (Baldwin et al., 1984).

Primäre Granula, die Granulozyten zur Einleitung des oxidativen Weges sezernieren, werden aufgrund ihrer sauren Intermediate auch azurophile Granula genannt und sind durch das Vorhandensein von Myeloperoxidase (MPO) charakterisiert. Der oxidative Weg wird zuletzt aktiviert. Hierbei wandert die NADPH-Oxidase zur Granulamembran und bildet unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff das toxische Superoxidradikalanion ( $\text{O}_2^-$ ). Weitere ROI entstehen durch spontane Dismutation von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Wasserstoffperoxid dient dem granulozytären Enzym MPO zur Generierung der zytotoxischen hypochlorigen Säure (HOCl). Außerdem sind eine entkoppelte NO-Synthase, die Xanthin-Oxidase oder die Atmungskette in Mitochondrien in der Lage ROI zu bilden (Cai et al., 2000). Einerseits können ROI von neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum abgegeben werden und mikrobizid in der Umgebung der Immunzellen wirken, andererseits sind Granulozyten in der Lage, Pathogene bis zu einer gewissen Größe über Phagozytose

aufzunehmen und sie nach Verschmelzung des Phagosoms mit lysosomalen Granula durch ROI abzutöten.

### 1.1.3. Rolle von neutrophilen Granulozyten bei der Tumor-Wirt-Interaktion

Solide Tumore bestehen nicht aus einer einheitlichen Zellpopulation. Vielmehr sind sie aus zwei voneinander abhängigen Kompartimenten zusammengesetzt. Einerseits gibt es dabei das Parenchym mit den neoplastischen Zellen und andererseits das Stroma, in welchem die neoplastischen Zellen eingebettet sind und dessen Wachstum von malignen Zellen induziert wird. Die vaskuläre Infrastruktur des Stromas ermöglicht den Tumorzellen einen Gasaustausch, eine Versorgung mit Nährstoffen, sowie einen Abtransport von Stoffwechselendprodukten. Solide wachsende Tumore beliebigen zellulären Ursprungs müssen Stroma induzieren, damit sie eine Größe von mehr als wenigen Millimetern Durchmesser erreichen können (Hanahan und Weinberg, 2000).

Der neutrophile Granulozyt spielt in der Entwicklung und Progression von Tumoren eine ambivalente Rolle, die kontrovers diskutiert wird. Auf der einen Seite sind die Neutrophilen wichtige Effektorzellen, die eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung mutierter Zellen einnehmen und somit Tumorwachstum und -progression verhindern können. Es konnte bei verschiedenen malignen Neoplasien früher Entwicklungsstufen gezeigt werden, dass eine vermehrte intratumorale granulozytäre Infiltration mit einer Reduktion der Entstehung von Metastasen und einer Steigerung der Überlebensrate bei den betroffenen Patienten verbunden ist (Di Carlo et al., 2001). Auf der anderen Seite weisen im Blutstrom zirkulierende Granulozyten in Tumorpatienten häufig eine erniedrigte zytotoxische Aktivität auf (Pekarek et al. 1995). Zudem können die Zytokine neutrophiler Granulozyten das umliegende Stroma modulieren, was das Wachstum von Tumorzellen erleichtert und die Bildung von Metastasen fördert. Gleichzeitig werden Granulozyten weniger suszeptibel gegenüber proapoptotischen Signalen. In verschiedenen tierischen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass die Einwanderung von Neutrophilen die Neoangiogenese des Tumors fördert, während die Depletion von Neutrophilen Neoangiogenese reduziert (Nozawa et al., 2006). Bei Melanompatienten im Stadium IV konnte eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut gemessen werden. Auch zeigte sich in diesem Patientenkollektiv, dass sich hohe Spiegel von Neutrophilen im Blut vor einer Immuntherapie als prognostisch ungünstiger Faktor für das Gesamtüberleben der Patienten erweisen (Schmidt et al., 2007). Es wurde beschrieben, dass Neutrophile in Karzinomen einen Einfluss auf die Pathophysiologie und den Verlauf der Krebserkrankung ausüben, indem sie T-Zellen hemmen und somit

immunsuppressiv wirken (Schmielau und Finn, 2001). Außerdem wird die Rolle von Granulozyten bei der Tumorphagenese durch die Tatsache unterstrichen, dass Tumore durch Aktivierung neutrophiler Granulozyten und ihrer hochreaktiven Radikale eine chronische Inflammation auslösen, welche durch genomische Veränderungen das Risiko einer malignen Transformation erhöht. Folglich fördert eine anhaltende Reaktivität der neutrophilen Granulozyten die Tumorprogression (Coussens und Werb, 2002). Diese Beobachtungen werden durch eine Studie untermauert, in der das Tumorstadium durch Eliminierung der Granulozyten unterdrückt werden konnte (Pekarek et al., 1995). Außerdem wird in einer aktuellen Studie beschrieben, dass TANs (tumorassoziierte Neutrophile) im Vergleich zu naiv zirkulierenden Granulozyten eine deutlich höhere Zytokinproduktion aufweisen. Diese hyperreaktive Aktivierung der Neutrophilen mit ihrer überschießenden Sekretion proinflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoff-Intermediate und extrazelluläre Matrix degradierender Proteasen führt schließlich *in vitro* und *in vivo* zu einer deutlichen Tumorprogression (Gregory und Houghton, 2011).

Jüngste Ergebnisse der HNO-Forschungsgruppe des Universitätsklinikum Essen zeigten, dass Tumorzellen von Kopf- und Halstumorpatienten in der Lage sind, mit Hilfe von Chemokinen die inflammatorische Aktivität von Granulozyten hochzuregulieren und die Produktion von tumorförderlichen Faktoren in neutrophilen Granulozyten zu steigern (Trellakis et al., 2011). Eines dieser Chemokine, welches von Tumorzellen gebildet wird, heißt Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor und seine Wirkung auf Granulozyten soll mit Hilfe dieser Arbeit beschrieben werden.

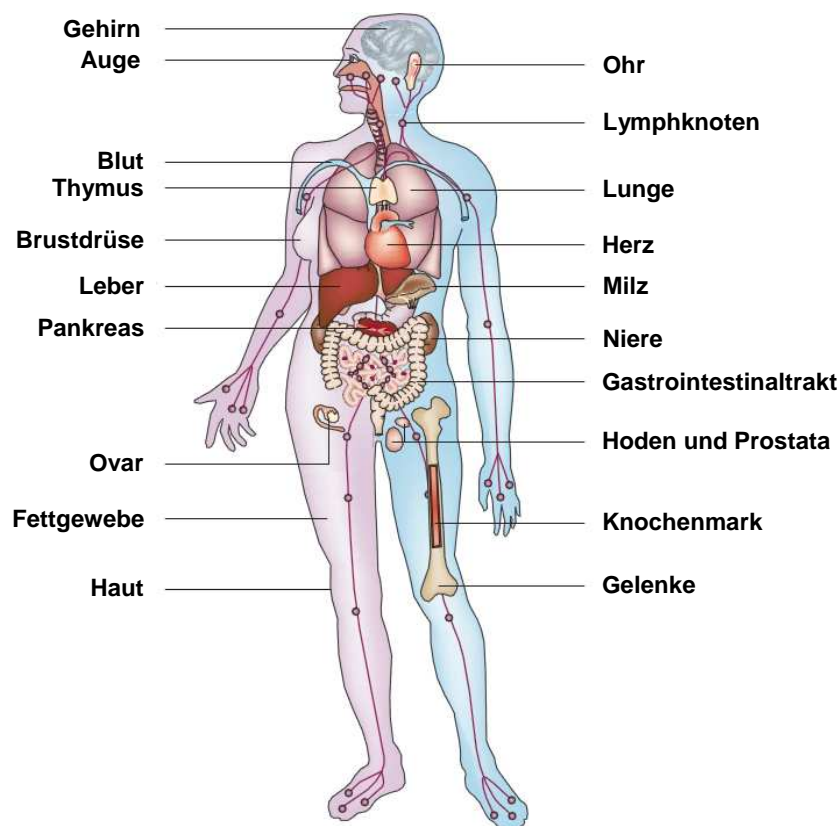
### 1.2. Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor

Der Makrophagen-migrationsinhibierende Faktor wurde 1966 das erste Mal beschrieben. Seinen Namen verdankt er seiner ursprünglich entdeckten Funktion. Die beiden Wissenschaftler Barry Bloom und John David isolierten in unabhängigen Laboren aus antigensensibilisierten Lymphozytenkulturen dieses bis dato unbekannte Protein, das die spontane Bewegung und Migration von Makrophagen inhibieren konnte (Bloom und Bennett, 1966). MIF war somit eines der ersten charakterisierten löslichen "Zytokine" und besitzt eine eindrucksvolle Geschichte. Zum damaligen Zeitpunkt steckte die Proteinaufreinigung noch in den Kinderschuhen, und man weiß heute, dass der von Bloom und David beobachtete Effekt auf kontaminierendes IL-4, Interferon- $\gamma$  oder andere Zytokine, welche ebenfalls hemmend auf die Migration von Makrophagen wirken, zurückzuführen ist. In den folgenden Jahren wurde MIF ausführlich hinsichtlich seiner Beeinflussung von Phagozytose, Adhärenz und Motilität

von Makrophagen charakterisiert. Sein Einfluss auf die Funktion von Granulozyten wurde hingegen bisher noch nicht ausreichend beschrieben.

### 1.2.1. Vorkommen und Struktur von MIF

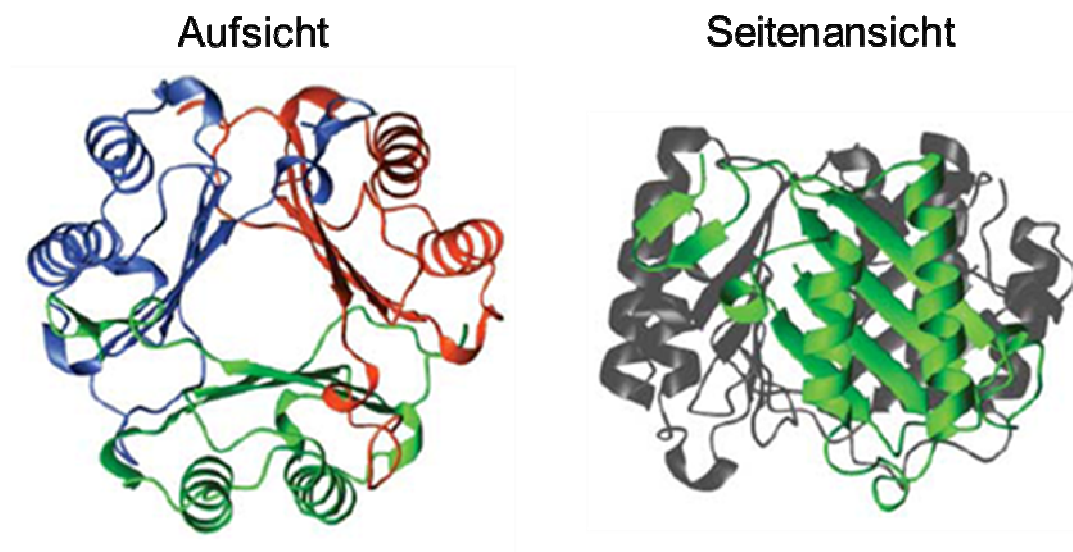
MIF konnte sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in den verschiedensten Gewebe- und Zelltypen nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass es in nahezu allen Zellen konstitutiv gebildet wird und seine Expression bei Stimulation gesteigert werden kann. MIF wird bei Mäusen bereits während der Embryogenese parallel zur Organogenese und Gewebespezifizierung synthetisiert (Kobayashi et al., 1999). Hohe Expressionsraten finden sich in verschiedenen Geweben des endokrinen Systems, vor allem in jenen, die für die Stressantwort des Organismus zuständig sind, wie z.B. Hypothalamus, Epiphyse und Nebennierenrinde (Abbildung 1). Weiterhin findet sich MIF in Organen, die mit der Umgebung in engem Kontakt stehen, wie Haut, Respirations-, Gastrointestinal- und Genitaltrakt. Vor allem aber wird es von Zellen des Immunsystems synthetisiert (Calandra und Roger, 2003). Auch bei Pflanzen, Nematoden und Vertebraten lassen sich Analoga von MIF finden. Dieses ubiquitäre Vorkommen lässt auf eine wichtige biologische Bedeutung schließen.



**Abbildung 1:** Expression von MIF im Menschen. MIF ist in Gehirn, Auge, Ohr, im Immunsystem (Blut, Lymphknoten, Thymus, Milz, Knochenmark), in Endothelzellen und Epithelzellen, in der Haut, im Knochenmark sowie in Gelenken lokalisiert (modifiziert nach Calandra und Roger, 2003)

Das MIF-Gen ist auf dem Chromosom 22q11.2 (Budarf et al., 1997) lokalisiert, ist 1.7 kb klein und setzt sich aus 3 Exons und 2 Introns zusammen.

Das MIF-Protein hat eine molekulare Masse von 12.5 kDa und setzt sich aus 115 Aminosäuren zusammen. Die Tertiärstruktur wurde mittels Kristallstrukturanalyse und Kernspinresonanzspektroskopie ermittelt (Abbildung 2). Sie bildet ein Homotrimer aus drei identischen Untereinheiten, welches über zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den  $\beta$ -Faltblättern sowie zwischen einer  $\alpha$ -Helix und dem Carboxylterminus stabilisiert wird. Eine Leucin-reiche hydrophobe Region ist außerdem mittels hydrophober Wechselwirkungen stabilisiert.

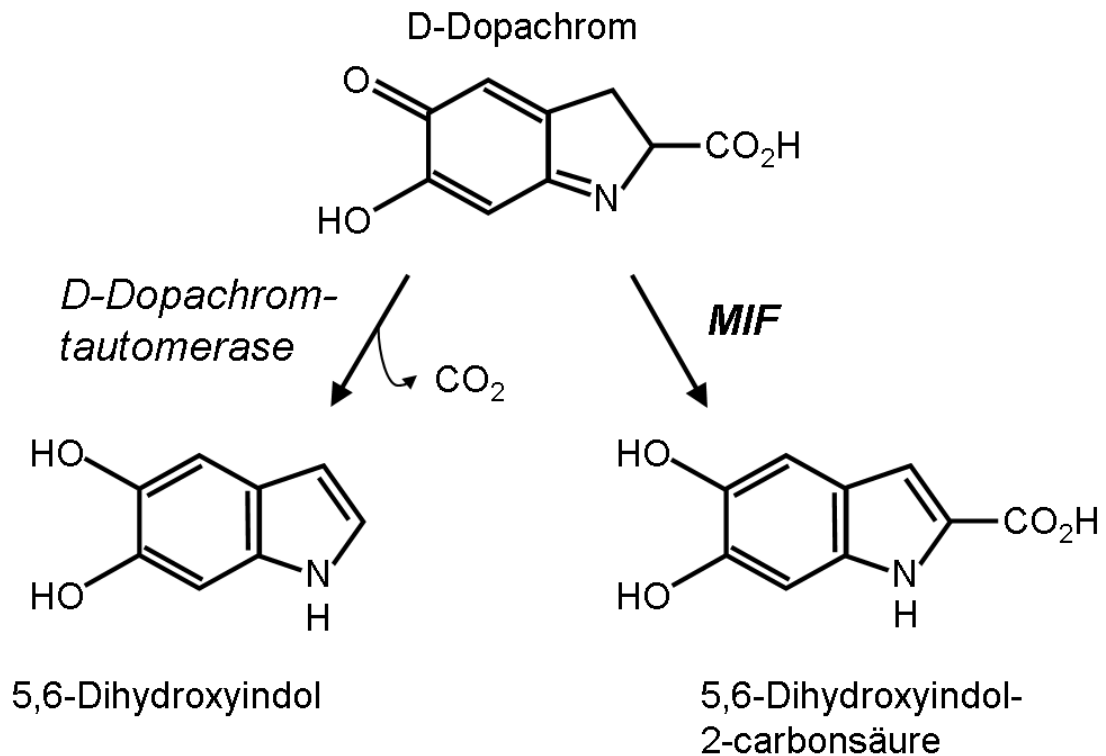


**Abbildung 2:** Dreidimensionale Struktur von MIF (modifiziert nach Calandra und Roger, 2003).

Die enzymatische Funktion von MIF steht seit Jahrzehnten im Fokus zahlreicher Untersuchungen. Hinweise auf seine katalytischen Eigenschaften liefert seine dreidimensionale Struktur. MIF ähnelt drei mikrobiellen Enzymen: der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, der 5-Carboxymethyl-2-hydroxymutonat Isomerase und der Chrosimat-Mutase (Calandra and Roger, 2003). Weiterhin kann MIF aufgrund seiner jeweils ähnlichen Tertiärstruktur die Funktion der D-Dopachrom-Tautomerase (DDT), Phenylpyruvat-Tautomerase und Thiol-Protein-Oxidoreduktase beeinflussen. DDT ist bei den letzten Stufen der Melaninbiosynthese beteiligt, in der es L-Dopachrom in 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (DHICA) enzymatisch tautomerisiert (Abbildung 3). Bei *in vitro* Versuchen mit Melanomzellen konnte festgestellt werden, dass MIF das D-Isomer von Dopachrom tautomerisch umwandelt (Rosengren et al., 1996). Die Gene der beiden Enzyme sind durch Gen-Duplikationsereignisse in der Evolution entstanden, was die große Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen erklärt. D-Dopachrom ist jedoch ein Substrat, welches

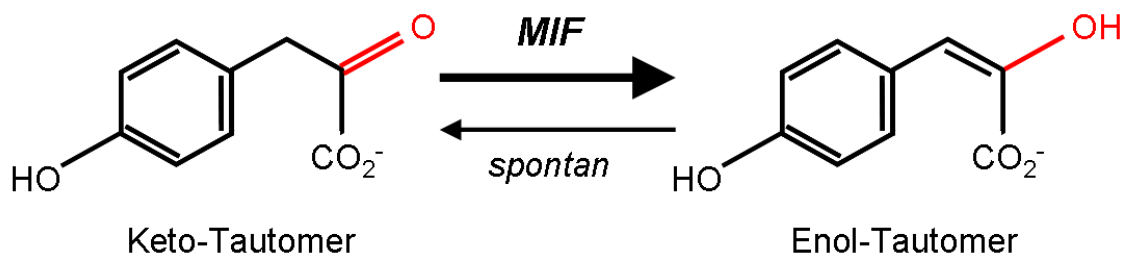


physiologischerweise nicht im menschlichen Körper vorkommt.



**Abbildung 3:** Die Umwandlung von D-Dopachrom durch MIF und D-Dopachrom Tautomerase

Auf der Suche nach natürlichen Substraten von MIF wurden p-Hydroxyphenylpyruvat und Phenylpyruvat entdeckt. Bei diesen Molekülen ist MIF in der Lage eine Tautomerisierung zu katalysieren (Abbildung 4). Dennoch bestehen Zweifel, dass es sich bei diesen Endprodukten des Phenylalanin- und Tyrosinabbaus um physiologische Substrate von MIF handelt.



**Abbildung 4:** MIF katalysiert die Keto-Enol-Isomerisierung von p-Hydroxyphenylpyruvat

Die Aminosäure Prolin am N-Terminus ist in jedem Falle essentiell für die katalytische Aktivität von MIF. Es gibt Hinweise, dass die Enzymwirkung für seine biologische Aktivität ausschlaggebend ist (Calandra and Roger, 2003).

### 1.2.2. Die Bindungspartner von MIF

MIF kann sowohl über einen extrazellulären als auch über einen intrazellulären Signalweg auf eine potenzielle Zielzelle wirken.

Beinahe 40 Jahre dauerte es, bis der erste MIF-bindende Rezeptor entdeckt wurde. Es handelt sich dabei um CD74, ein nicht polymorph vorkommendes integrales Typ II Membranprotein, dem ursprünglich lediglich eine Funktion als MHC-Klasse-II Chaperon zugeschrieben wurde (Leng et al 2003). Mit dieser Entdeckung bekam MIF als Zytokin ein neues Gewicht. MIF bindet an Makrophagen an die extrazelluläre Domäne von CD74 und führt über Aktivierung des MAPK-Signalwegs zur Proliferation der Zelle (Leng et al., 2003). CD74 benötigt zusätzliche transmembranäre Co-Rezeptoren für seine Signaltransduktion. In dem Zusammenhang scheint das Adhäsionsmolekül CD44 für die durch MIF vermittelte Phosphorylierung der ERK 1/2-Kinase erforderlich zu sein (Shi et al., 2006). Die Aktivierung dieser beiden Rezeptoren ist für die Hemmung der Spontanapoptose erforderlich.

MIF wurde auch als ein Ligand für die Chemokinrezeptoren CXCR2 und CXCR4 charakterisiert (Bernhagen et al., 2007). Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie ist in dieser Studie beschrieben worden, dass CXCR2 mit dem MHC-II-Chaperon CD74 co-lokalisiert ist. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass CD74 dabei mit CD44 interagiert und MIF zu einer Serin-Phosphorylierung von CD74 und CD44 führt (Shi et al., 2006). Dies deutet darauf hin, dass der von MIF aktivierte Signalweg über einen kombinierten CD74/CD44/CXCR2-Komplex vermittelt wird. Durch die Interaktion mit den beiden Rezeptoren CXCR2 und CXCR4 ist MIF in der Lage, die Rekrutierung von Monozyten sowie von T-Zellen in entzündetes Gewebe zu fördern. CXCR2 ist außerdem auf Granulozyten exprimiert und beeinflusst deren Migration (Weisel et al., 2009).

MIF ist auch reichlich im Zytosol von Zellen vorhanden. Nach nicht-Rezeptor-vermittelter Endozytose bindet MIF an das intrazelluläre Protein Jab-1/CSN5 (Burger-Kentischer et al., 2005). Jab-1/CSN5 ist ein Co-Aktivator des Transkriptionsfaktors Aktivator-Protein-1 (AP-1). Es konnte gezeigt werden, dass MIF die Jab-1/CSN5-abhängige AP-1-Transkription hemmt. Weiterhin begünstigt MIF die Stabilisierung des Zellzyklusinhibitors p27<sup>Kip1</sup>, indem es den Jab-1/CSN5-vermittelten Abbau von p27<sup>Kip1</sup> inhibiert (Kleemann et al., 2000). p27<sup>Kip1</sup> hat seinerseits die Fähigkeit einen Proliferationsstop in Zellen auszulösen. Andere bekannte Zielstrukturen von Jab-1/CSN5 sind das Tumorsuppressorgen p53 oder der Hypoxie induzierende Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) (Bech-Otschir et al. 2001; Bae et al., 2002).

### 1.2.3. Immunmodulatorische Beteiligung von MIF bei Erkrankungen

Die Bedeutung des MIF-Proteins bei der inflammatorischen Reaktion des Organismus wird durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen verdeutlicht. So zeigte sich, dass MIF<sup>-/-</sup>-Mäuse nach LPS-Injektion deutlich verminderte Level an IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  aufwiesen (Calandra et al., 1995). Dieser Zusammenhang spielt besonders bei der Sepsis eine entscheidende Rolle. Durch Gabe von neutralisierenden MIF-Antikörpern konnte *in vivo* die Überlebensrate bei Lipopolysaccharid (LPS)-induzierter Sepsis entscheidend erhöht werden (Calandra et al., 2000). Es ist bereits beschrieben, dass die Symptome der Sepsis durch Einnahmen von Glukokortikoiden reduziert werden können. Im Umkehrschluss kann MIF als Antagonist von Glukokortikoiden wirken, indem es deren protektiven Effekt im septischen Organismus aufhebt. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, aber auch die Freisetzung von Produkten des Arachidonsäuremetabolismus und von Stickstoffmonoxid (NO) sein (Calandra et al., 2000). Auch bei Patienten mit akutem respiratorischem Atemnotsyndrom (ARDS) sind alveolär erhöhte Konzentrationen von MIF gemessen worden (Donnelly, 1997). Dadurch wird die Anzahl und Aktivität der neutrophilen Granulozyten erhöht, was im Verlauf der ARDS-Erkrankung zu einem Zusammenbruch der alveolären Epithelmembran führt.

Des Weiteren spielt MIF bei der Entstehung atherosklerotischer Plaques, sowie als Mediator von Immunreaktionen des Spättyps bei der Rheumathoiden Arthritis eine wichtige Rolle (Bernhagen et al., 2007; Morand et al., 2006). Außerdem weist MIF eine immunmodulatorische Beteiligung beim Krankheitsverlauf von Multipler Sklerose, Dermatitis, Kolitis, Morbus Crohn, Asthma bronchiale, Pankreatitis, IgA-Nephritiden und dem Typ II-Diabetes auf (Lue et al., 2002).

Dadurch wird verdeutlicht, dass MIF durch seine entzündungsfördernde Eigenschaft einen entscheidenden Platz in der immunologischen Modulation von Krankheitsverläufen einnimmt.

### 1.2.4. Bedeutung von MIF in der Tumorphagenese

Gestörte Regulation der Zellproliferation und fehlerhafte Differenzierung von Zellen sind wesentliche Charakteristika in der Tumorgenese. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, Mediatoren zu erforschen, die in diesen komplexen Zusammenhang eingreifen. MIF ist wesentlich an der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung beteiligt.

Eine MIF-Expression ist in vielen verschiedenen epithelialen Tumoren beschrieben und korreliert mit dem Tumorwachstum. Konkret wurde diese Korrelation für Kolon-, Prostata-

und das hepatozelluläre Karzinom beschrieben (Legendre et al., 2003; Meyer-Siegler et al., 2002; Hira et al., 2005).

MIF beeinflusst das spezifische Immunsystem dadurch, dass es die Produktion von Zytokinen wie IL-2, TNF- $\alpha$  und insbesondere IFN- $\gamma$  in Th1-Zellen steigert (Takase et al., 2002). Durch diese Zytokine wird u.a. das unspezifische Immunsystem, vor allem natürliche Killerzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten aktiviert und eine nachhaltige Entzündungsreaktion in Gang gesetzt. Diese Entzündungsreaktion wiederum kann MIF durch NO vermittelte intrazelluläre Akkumulation von p53 in Makrophagen verstärken (Mitchell et al., 2002; Calandra und Roger, 2003). P53 ist ein Tumorsuppressorgen, welches den Zellzyklus hemmt und die Apoptose induziert (Attardi et al., 1996). Die proinflammatorische Wirkung von MIF zusammen mit seiner Rolle in der Unterdrückung von p53 führte zu dem Konzept, dass MIF eine molekulare Verbindung zwischen Entzündung, Zellwachstum und Tumorgenese darstellt (Calandra und Roger, 2003).

Neueste Studien zeigen weiterhin, dass MIF die Funktion des Signalmoleküls VEGF moduliert, seine Produktion erhöht und dadurch die Differenzierung von Endothelzellen in Blutgefäßen verbessert (He et al., 2009). Diese Induktion der Neoangiogenese korreliert direkt mit dem Wachstums- und Metastasierungspotential von Tumoren.

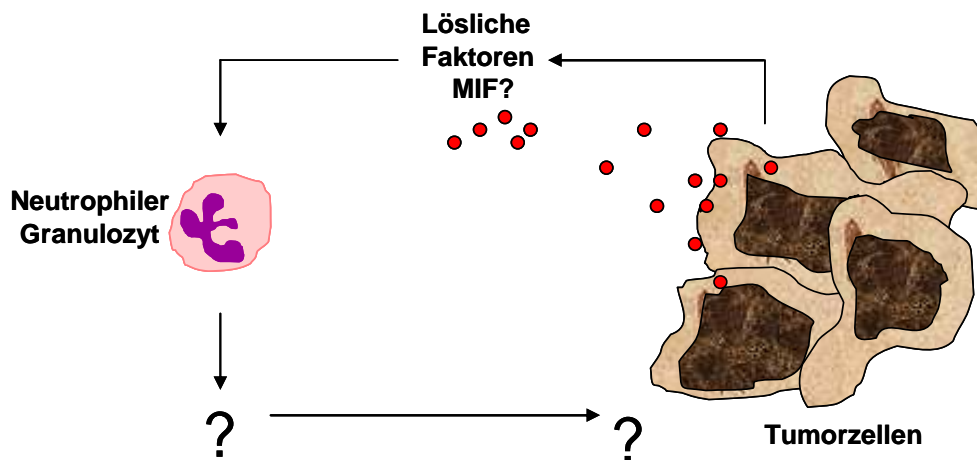
Ein anderer wichtiger Mechanismus des MIF-Moleküles ist die anhaltende Aktivierung der ERK-MAP-Kinase. Die ERK-MAP-Kinase ist in der Regulation des Immunsystems, der Zellproliferation und der Angiogenese von Bedeutung und führt unter anderem zur Aktivierung der Phospholipase A2, einer kritischen Komponente der proinflammatorischen Kaskade. Das Endprodukt dieser Kaskade, die Arachidonsäure, ist eine Vorstufe der Prostaglandine und Leukotriene. Diese wiederum sind kennzeichnend für Entzündungsprozesse. Jüngst wurde ihnen außerdem eine wichtige Rolle bei der Tumorentwicklung zugeschrieben (Mitchell und Bucala, 2000). Außerdem beeinträchtigt MIF die physiologische Reaktion auf genetische Schäden und fördert die Akkumulation von onkogenen Mutationen (Cordon-Cardo und Prives, 1999).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MIF durch Unterhaltung chronischer Entzündungsprozesse auf der einen Seite und durch Eingriffe in den Zellzyklus auf der anderen Seite eine Tumorentstehung begünstigt. Über den Weg der chronischen Inflammation bis zur Tumorentstehung und -progression tritt MIF als zentraler Modulator in der Tumorphagenese in Erscheinung und rückt ins Zentrum der vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchung.

## 2. Zielsetzung

MIF spielt in unterschiedlichen biologischen Prozessen wie Wachstum, Proliferation, Entzündung und Tumorgenese eine wichtige Rolle. In bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass MIF die maligne Transformation fördert und somit als Tumorpromoter klassifiziert werden kann. Auch ist eine Interaktion des MIF-Moleküles mit Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen bekannt. Die Modulation der Granulozyten-Funktionen durch MIF wurde bis dato noch nicht ausreichend aufgeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden.

1. Sezernieren Tumorzellen von Kopf- und Halstumorpatienten MIF?
2. Welche Funktionen von neutrophilen Granulozyten werden durch MIF aus Tumorzellen moduliert?
3. Welche Faktoren werden von den beeinflussten Granulozyten ausgeschüttet?



### 3. MATERIALIEN

#### 3.1. Chemikalien

<b>Aceton</b>	AppliChem Darmstadt, Deutschland
<b>Acrylamid</b>	Roth Kalsruhe, Deutschland
<b>Ammoniumpersulfat (APS)</b>	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
<b>CASY-Ton</b>	Roche/Innovatis-Ag-Casy-Technology Reutlingen, Deutschland
<b>Citrat</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Citronensäure</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Roth Kalsruhe, Deutschland
<b>Dihydrorhodamin 123</b>	Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
<b>Eosin</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Gelatine</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Glycerin</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Glycin</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Hämalaunlösung</b>	Roth Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	AppliChem Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Kathon</b>	Rohm und Haas Morges, Schweiz

<b>Methanol</b> (CH <sub>4</sub> O)	JT.Backer Deventer, Niederlande
<b>Natrium Chlorid</b> (NaCl)	Roth Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b> (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumazid</b> (NaN <sub>3</sub> )	AppliChem Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumdodecylsulfat</b> (SDS)	Serva Electrophoresis Heidelberg, Deutschland
<b>Polyoxyethylen 20</b> (Tween 20)	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Para-Formaldehyd</b> (PFA)	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Rinder Serumalbumin</b> (BSA)	PAA Paschingen, Östereich
<b>Salzsäure</b> (HCl)	Roth Karlsruhe, Deutschland
<b>Schwefelsäure</b> (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	AppliChem Darmstadt, Deutschland
<b>Tetramethylethyldiamin</b> (TEMED)	Roth Karlsruhe, Deutschland
<b>Tromethamin</b> (Tris)	AppliChem Darmstadt, Deutschland
<b>Triton X-100</b>	Riedel-de Haën Seelze, Deutschland
<b>Tetramethylbenzidin</b> (TMB)	Fluka BioChemika Buchs, Schweiz
<b>Xylol</b>	S JT.Backer Deventer, Niederlande

### 3.2. Puffer und Lösungen

<b>Azid-PBS</b>	150 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15 mM NaN <sub>3</sub> pH 7,4
<b>ELISA-Waschpuffer</b>	0,05% Tween 20 in PBS
<b>Laemmli-Laufpuffer</b>	12,35 mM Tris Base 78,26 mM Glycin 17 mM SDS
<b>Page-A</b>	3 M Tris Base pH 8,8
<b>Page-B</b>	3 M Tris Base pH 6,8
<b>PBS</b>	150 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
<b>Polyvinylalkohol-Lösung (PVA)</b>	1 % Polyvinylalkohol 0,9 % NaCl in H <sub>2</sub> O
<b>Reagent Diluent für MIP1β</b>	10 % PBS 1 % BSA In H <sub>2</sub> O
<b>Rxx10</b>	RPMI 1640 1 % PS (Penicillin/Streptomycin) 10 % FCS
<b>TBS</b>	10mM Tris Base 150mM NaCl
<b>TMB-Lösung</b>	0,48 % TMB 10 % Aceton 90 % Ethanol 0,6 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>TMB-Substratpuffer</b>	33 mM Citronensäure 0,02 % Kathon in H <sub>2</sub> O pH 4,1



<b>Zymographie-Inkubationspuffer</b>	50mM Tris pH 7,5 200 mM NaCl 5mM CaCl <sub>2</sub> 1% Triton
<b>Zymogram Probenpuffer</b>	0,4 M Tris pH 6,8 5 % SDS 20 % Glycerin 0,03 % Bromphenolblau

### 3.3. Zellkulturmaterialien

<b>Accutase</b>	PAA-Laboratories GmbH Coelbe, Deutschland
<b>CryoPure-Gefäß (1,8ml)</b>	Sarstedt Numbrecht, Deutschland
<b>Fetales Kälberserum (FCS)</b>	Biochrom Berlin, Deutschland
<b>Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077-Lymphocyte</b>	PAA-Laboratories GmbH Coelbe, Deutschland
<b>PS (Penicillin/Streptomycin)</b>	PAA-Laboratories GmbH Coelbe, Deutschland
<b>Pasteurpipette</b>	Sarstedt Numbrecht, Deutschland
<b>RPMI 1640</b>	PAA-Laboratories GmbH Coelbe, Deutschland
<b>Reagiergefäße 1,5ml</b>	Sarstedt Numbrecht, Deutschland
<b>Transferpipette</b>	Sarstedt Numbrecht, Deutschland
<b>Transwell 3 µm</b>	Beckton Falcon New York, USA
<b>Transwellplatte</b>	Beckton Falcon New York, USA
<b>Zentrifugenröhrchen 15ml</b>	Sarstedt Numbrecht, Deutschland
<b>Zentrifugenröhrchen 50ml</b>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland

<b>Zellkulturflaschen 75cm<sup>2</sup></b>	Sarstedt Numbrecht, Deutschland
<b>12-well Kultur-Platte</b>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
<b>24-well Kultur-Platte</b>	Sarstedt Numrecht, Deutschland

### 3.4. Antikörper und Liganden

<b>anti-CD45</b> Kaninchen polyklonal, Klon: H-230	Santa cruz biotechnology Santa Cruz, USA
<b>anti-EpCAM</b> Kaninchen polyklonal, Klon: C-10	Santa cruz biotechnology Santa Cruz, USA
<b>anti-Lactoferrin-Biotin</b> Kaninchen polyklonal, Klon: ab25811	Santa cruz biotechnology Santa Cruz, USA
<b>anti-MIF</b> Maus polyklonal, Klon: 12302	Abcam Cambridge, England
<b>anti-MIF</b> Kaninchen polyklonal, Klon: FL-15	R&D Abington, England
<b>anti-Maus-FITC</b> Schwein polyklonal	Santa cruz biotechnology Santa Cruz, USA
<b>anti-Maus-Cy3</b> Ziege polyclonal	Dako Glostrup, Dänemark
<b>Maus IgG1</b>	Merck Darmstadt, Deutschland
<b>Streptavidin-APC</b> Klon: 9024	BD-Biosciences San Jose, USA
<b>Ziege IgG</b>	BD-Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
<b>Iso-1 ((S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-Dihydro-5-Isoxazolesäuremethylester)</b>	Dianova Hamburg, Deutschland

### 3.5. Kits

<b>BD Annexin V-PE/7AAD</b>	BD-Biosciences San Jose, USA
<b>BD Cytofix/Cytoperm</b>	BD-Biosciences San Jose, USA
<b>MIP1<math>\beta</math> ELISA Kit</b>	R&D Abington, England

### 3.6. Stimulanzen

<b>Lipopolysaccharid (LPS)</b>	Forschungszentrum Borstel Biophysik, Dr. Klaus Brandenburg
<b>Rekombinanter Makrophagen Migration Inhibierender Faktor (rek. MIF)</b>	R&D Abington, England

### 3.7. Zelllinien

<b>FaDu</b>	1968 entstandene Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx ATCC Maryland, USA
-------------	---

### 3.8. Andere Materialien

<b>Aqua B. Braun</b>	B.Braun Melsungen, Deutschland
<b>Ausschwingrotor für Zyto-Gehänge</b>	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Casy-Cups</b>	Innovatis-Roche Bielefeld, Deutschland
<b>Deckgläser (quadratisch)</b>	Roth Karlsruhe, Deutschland
<b>Deckgläser (rund)</b>	Roth Karlsruhe, Deutschland
<b>ImmEdge Stift</b>	Vector Peterborough, England

<b>Filterkarten</b>	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Fluoprep</b>	Biomerieux, Marcey-l'Etoile, Frankreich
<b>SuperFrost Objekträger 76 x 26 mm</b>	Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
<b>Spannplatte u. Spannring</b>	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Tissue-Tek Cryomold, Biopsy Einweg-Vinylformen</b>	Sakura Torrance, USA
<b>Tissue-Tek O.C.T.<sup>TM</sup> COMPOUND</b>	Sakura Torrance, USA
<b>Zytogehänge</b>	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Zytokammer mit Dichtung</b>	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Zytokammer</b>	Thermo Scientific Bonn, Deutschland
<b>96-well ELISA Mikrotiter-Platte</b>	Nunc Dänemark

### 3.9. Spezielle Laborausrüstung

<b>CASY-Modell TT</b>	RocheInnovatis-AG-Casy-Technology Bielefeld, Deutschland
<b>System bestehend aus:</b> Dünne und dicke Glasplatten Gussteilständer Gussteilspangen Elektrodenbausatz	Bio Rad Hercules, USA
<b>FACS Canto</b>	BD Heidelberg, Deutschland
<b>FACS Calibur</b>	BD Heidelberg, Deutschland
<b>Gefrierschrank (-80 °C)</b>	Sanyo München, Deutschland

<b>Hettich Zentrifuge</b> (universal 320)	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Hettich Zentrifuge</b> (Rotina 420R)	Hettich Tuttlingen, Deutschland
<b>Kryostat</b>	Leica Wetzlar, Deutschland
<b>Stickstofftank</b>	Taylor-Wharton Mildstedt, Deutschland
<b>Vectashield</b>	Linaris Wertheim, Deutschland
<b>Zeiss-Mikroskop</b>	Zeiss Jena, Deutschland

### 3.10. Patientenmaterial

Im Rahmen dieser Studie wurde Blut gesunder Spender und Gewebe von Tumorpatienten verwendet. Hierfür lag eine Genehmigung der Ethik-Kommission vor.

Nach Aufklärung der Patienten wurde durch Antrag bei der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen mit den Aktenzeichen 07-3500 für Tumorgewebe und 08-3590 für gesunde Spender eine Genehmigung für Versuche mit Patienten- und gesundem Spendermaterial eingeholt.

## 4. METHODEN

### 4.1. Zellkulturtechniken

#### 4.1.1. Zellkultur etablierter Zelllinien (FaDu)

##### 4.1.1.1. Kultur und Passage von Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete FaDu-Zelllinie eines humanen Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx wurde bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> in Kulturmedium kultiviert. Die Wachstumskonfluenz der Zellen wurde mit dem Lichtmikroskop untersucht, um eine rechtzeitige Passagierung der adhärennten Zellen zu gewährleisten. Zur Ablösung der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit Accutase für 3 min bei 37°C inkubiert. Die in Suspension überführten Zellen konnten unter dem Lichtmikroskop analysiert werden. Nach einer Zentrifugation der Zellsuspension mit 300 g für 7 min konnten die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, mit dem CASY-Counter gezählt, in eine neue Kulturflasche überführt und bei 37 °C weiter kultiviert werden.

##### 4.1.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Grundprinzip einer erfolgreichen Gefriererhaltung sind ein langsames Einfrieren und ein schnelles Auftauen. Als Gefriermedium wurde Kulturmedium mit 20% FCS und 10% DMSO verwendet, welches zuvor auf 4°C gekühlt worden war. DMSO bewahrt die Zellen vor Kristallformationen und schützt so vor Zellerissen. Die Zellen wurden mit dem Casy-Counter gezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml Gefriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend in Cryogefäße gebracht und über Nacht bei -80°C in Cryo 1C Gefrier-Container verwahrt. Zur längerfristigen Lagerung diente ein mit flüssigem Stickstoff gefüllter Tank. Zum Auftauen der Zellen wurden diese vom Stickstofftank in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und die Zellsuspension zügig in einem Zehnfachen des Einfriervolumens mit Kulturmedium, welches 40% FCS enthielt, verdünnt. So lag die Endkonzentration von DMSO nach dem Auftauen bei unter 1%. Schließlich wurden die Zellen in Kulturflaschen transferiert und bis zum weiteren Gebrauch bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt.

##### 4.1.1.3. Herstellung von FaDu-Kulturüberstand

FaDu-Zellen schütten während ihrer Kultivierung verschiedene Faktoren aus, welche im Zellkulturüberstand akkumulieren und diesen somit konditionieren. Um diesen Überstand

reproduzierbar herzustellen, gab man FaDu-Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in eine Kulturflasche und ließ diese für 24 Stunden inkubieren. Anschließend ließ sich der Überstand abnehmen, mit 3607 g zentrifugieren und so von Partikeln und zellulären Resten befreien. Nach Aliquotierung des Überstandes wurde dieser eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

#### 4.1.1.4. Zellzahlbestimmung mit dem CASY-Counter

Der CASY-Counter kombiniert bei der Zellzahlbestimmung das Prinzip der Widerstandsmessung mit der Pulsflächenanalyse. Die Zellen werden hierbei zwischen zwei Platinelektroden, zwischen denen eine elektrische Spannung angelegt ist, angesaugt. Da die Impulsfläche proportional zum Zellvolumen ist, kann zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Für Messungen wurde eine in CasyTon 1:1000-fach verdünnte Zellsuspension in das Gerät gestellt. Der Casy-Counter gibt die Zellzahl in  $1 \times 10^6$  Zellen/ml an.

#### 4.1.2. Isolation neutrophiler Granulozyten aus Vollblut

Die Blutleukozyten wurden mit Hilfe der Dichtezentrifugation in neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen aufgetrennt. Alle verwendeten Flüssigkeiten mussten hierbei Raumtemperatur besitzen. Das aufzutrennende Blut wurde beim Abnehmen mit Citrat in einer Endkonzentration von 0,94% vermischt und anschließend im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. 50 ml Test-Röhrchen wurden zu 1/3 mit Lymphozyten-Separationsmedium (Ficoll) befüllt und mit dem Blut-PBS-Gemisch im Verhältnis 2:1 überschichtet. Die so befüllten Röhrchen wurden für 20 min bei 290 g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die über der Interphase schwimmenden mononukleären Zellen wurden mittels Pasteurpipette abgenommen. Die Granulozyten wurden mit einer Transferpipette unter vorsichtigem Saugen über dem Erythrozytensediment im Gitternetzmuster und am Rand des Röhrchens entlang geerntet. Da die so geerntete Suspension neben den Granulozyten noch Erythrozyten enthielt, mussten diese anschließend entfernt werden. In einem ersten groben Trennungsschritt wurde die Suspension im Verhältnis 1:1 mit 0,1% PVA-Lösung vermischt. Nach 25 min Erythrozytensedimentation wurden die im Überstand befindlichen Granulozyten abgenommen, in ein 50 ml Test-Röhrchen überführt und diese mit PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden zentrifugiert, ihr Überstand abgesaugt und zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml vorgewärmtem Aqua Braun resuspendiert. Nach 25 Sekunden wurde die Lyse mit 5 ml zweifach konzentriertem PBS abgestoppt und das 50 ml Test-Röhrchen mit PBS aufgefüllt.

Nach erneuter Zentrifugation konnte der Überstand abgesaugt, die aufgereinigten Granulozyten in Kulturmedium resuspendiert und mittels Casy-Counter gezählt werden. Mit dieser Methode lässt sich eine Reinheit der Granulozyten von über 98% erreichen.

## 4.2. Zytometrische Techniken

### 4.2.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse und Sortierung von Zellen, abhängig von ihrer Größe und Antigenen. Letztere müssen bei diesem Verfahren zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Mittels Druckluft wird die Zellsuspension dann in eine Kapillare gepresst, wobei ein Flüssigkeitsstrahl erzeugt wird und die Zellen hintereinander einen Laserstrahl passieren. Dabei entsteht Streulicht und die Emission von Fluoreszenz der Zielzellen kann erfasst werden. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter) gibt Auskunft über die relative Größe der Zielzellen, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (side scatter) ein Maß für die Granularität der Zellen ist (Nebe-von-Caron et al., 2000).

#### 4.2.1.1. Markierung intrazellulärer Moleküle

Zum durchflusszytometrischen Nachweis intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in Cytofix/Cytoperm fixiert und permeabilisiert. Zum Waschen wurde in jedes Röhrchen Perm/Wash-Buffer gegeben und bei 420 g für 3 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde zum Pellet in Perm/Wash-Buffer verdünnter primärer Antikörper bzw. der entsprechende Isotyp gegeben. Nach 45 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschriff mit PBS und die Analyse der Zellen.

Das intrazelluläre Molekül Lactoferrin, Bestandteil sekundärer Granula von Granulozyten, wurde auf diese Weise gemessen.

Um eine Lactoferrinausschüttung bei Granulozyten zu induzieren, wurde FaDu-Kulturüberstand bzw. rekombinantes MIF verwendet. Bei der Stimulation mit FaDu-Kulturüberstand wurde eine Zellsuspension mit  $1 \times 10^6$  Granulozyten/500  $\mu$ l mit 420 g für 3 min zentrifugiert, die Zellen in FaDu-Kulturüberstand resuspendiert und 1 Stunde bzw. 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde mit 420 g für 3 min zentrifugiert. Dann wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, um sie bei Raumtemperatur 45 min mit 1  $\mu$ g/ml Biotin-



gekoppeltem Kaninchen-anti-Lactoferrin-Antikörper und weitere 30 min mit Streptavidin-APC 1:20 zu inkubieren.

Für die Stimulation mit rekombinantem MIF wurden  $1 \times 10^6$  Granulozyten/500  $\mu$ l mit 10 ng/ml rekombinantem MIF für 1 Stunde sowie 2 Stunden inkubiert. Für die Färbung wurde 45 min mit 1  $\mu$ g/ml Biotin-gekoppeltem Kaninchen-anti-Lactoferrin-Antikörper und weitere 30 min mit Streptavidin-APC 1:20 bei Raumtemperatur inkubiert.

### 4.2.1.2. Nachweis apoptotischer Granulozyten

Nach Stimulierung der neutrophilen Granulozyten mit Fadu-Kulturüberstand für 24 Stunden wurde zur Detektion apoptotischer Zellen eine Färbung mit Annexin V-PE durchgeführt. Während des frühen apoptotischen Zelltods erfolgt die Translokation von Phosphatidylserin zur Außenseite der Plasmamembran. Es wird somit zugänglich für Annexin, ein kalziumabhängiges Phospholipidbindungsprotein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin. Zur Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose, wurde eine 7AAD-Färbung durchgeführt.

7AAD besitzt die Eigenschaft in DNA zu interkalieren und dabei rote Fluoreszenz zu emittieren. Dieses Molekül kann die Zellwand nur penetrieren, wenn die Zelle ihre Membranintegrität verloren hat. Diese Technik erlaubt es, zwischen lebenden Zellen (Annexin negativ, 7AAD negativ), früh apoptotischen (Annexin positiv, 7AAD negativ) sowie spät apoptotischen und nekrotischen Zellen (Annexin positiv, 7AAD positiv) zu differenzieren.

Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 7-AAD und Annexin V je 1:100 in Annexin-Binding-Puffer bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde mit Annexin-Binding-Puffer gewaschen. Durch anschließende durchflusszytometrische Analyse konnte eine Aussage über das Überleben der Zellen getroffen werden.

### 4.2.1.3. Detektion Reaktiver Sauerstoff-Intermediate (ROI) in Granulozyten

Die von Granulozyten phagozytierten Mikroorganismen und beschädigten Zellen werden durch ROI vernichtet. Ein Verfahren zur Bestimmung von ROI ist die Verwendung der nicht fluoreszierenden, reduzierten Fluoreszenzfarbstoffvorstufe Dihydrorhodamin-123 (DHR-123). Bei dieser Methode wird als Maß für den Gehalt an Wasserstoffperoxid die Bildung von Rhodamin-123 (R-123) mittels einer myeloperoxidaseabhängigen Oxidation von DHR-123 zum grün fluoreszierenden Metaboliten R-123 durchflusszytometrisch erfasst.

In dem Ansatz wurden  $0,1 \times 10^6$  Granulozyten in 0,1 ml FaDu-Kulturüberstand resuspendiert und mit 50  $\mu$ M Iso-1 für eine Stunde inkubiert. Als Kontrolle diente Kulturmedium ohne bzw. mit Iso-1. Es folgte die Inkubation mit 25  $\mu$ g/ml DHR-123 bei 37°C für 15 min, anschließend eine Inkubation auf Eis für 15 min zum Abstoppen der Reaktion und letztlich die durchflusszytometrische Messung von R-123. Die gemessene Menge an R-123 ist direkt proportional zu der von den Granulozyten ausgeschütteten Menge an reaktiven Sauerstoff-Intermediaten.

### 4.2.2. Zytospins von Granulozyten

Die Zytospins der Granulozyten dienten dazu, die Spezifität der verwendeten intrazellulären Antikörper zu prüfen.

Nach Fixierung und Permeabilisierung mit Cytofix/Cytoperm für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden primären Antikörper für 45 min ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde für weitere 30 min dazugegeben. Um den Zellkern sichtbar zu machen, wurde mit 7-AAD 1:100 für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Färbungsschritt wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend in PBS mit 60% FCS auf einen Objektträger in die Zytokammer pipettiert und schließlich mit 61 g für 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Proben mit Fluoprep eingedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

## 4.3. Histologische Techniken

### 4.3.1. Einfrieren von Tumorgewebe

Tumorproben wurden durch Einfrieren für spätere Untersuchungen konserviert. Es war darauf zu achten, dass nach der Entnahme des Tumorgewebes schnell gearbeitet wurde, damit die Proben keinen Schaden nahmen. Dazu wurde Tissue Tek O.C.T. in Tissue Tek Cryomold Einweg-Vinylformen vorgelegt, das Gewebe darin eingebettet und mit Tissue Tek O.C.T. bedeckt. Die Probe konnte nun in flüssigem Stickstoff eingefroren werden und längerfristig bei -80°C gelagert werden.

### 4.3.2. Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung der Gefrierschnitte wurden die Gewebelöcke aus den Tissue Tek Cryomold Formen entnommen und innerhalb des Kryostates bei -21°C bearbeitet. Der Gewebelöcke wurde am Probenhalter befestigt und in 7  $\mu$ m dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden dann

auf Super-Frost-Plus Objektträger gebracht. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem angeschnittenen Material auch tatsächlich um malignes Gewebe handelte, wurde eine Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung durchgeführt. Wenn das zu untersuchende Gewebe die Charakteristika des malignen Gewebes erfüllte, wurden weitere Schnitte für spätere Analysezwecke angefertigt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 4.3.3. Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung

Die HE-Färbung ist bei jedem Schnitt unbedingt notwendig. Sie dient der mikroskopischen Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen. Hämatoxylin kann als Farbstoff aus dem Extrakt des Blauholzbaumes isoliert werden. Damit seine färbende Eigenschaft entwickelt werden kann, muss dieser Farbstoff durch Zusatz eines Oxidationsmittels zu Hämalan aufgearbeitet werden. Durch Hämalan werden alle basophilen bzw. sauren Strukturen, wie Zellkern mit der darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER), blau gefärbt. Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der alle azidophilen bzw. basischen Strukturen rot färbt. Diese umfassen vor allem die Zellplasmaeigenschaften. Wichtige Kriterien für die Unterscheidung zwischen gesundem und malignem Gewebe sind das Kern/Plasma-Verhältnis, sowie die Homogenität der Zellen und Zellkerne untereinander.

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst für 5 min in 96% Ethanol und dann für 2 min in 70% Ethanol rehydriert, kurz in destilliertes Wasser gebracht und für 10 min in gefiltertem Hämatoxylin gefärbt. Die Schnitte wurden 10 min unter fließendem Wasser gebläut und dann in gefiltertem Eosin mit einigen Tropfen Essigsäure für 3 min inkubiert. Nach aufeinander folgenden Waschschritten in 70% und 96% Ethanol wurden die Schnitte wenige Sekunden in Isopropanol getaucht und zweimal je 5 min in Xylol geklärt. Die Proben konnten nun in Roth Histokit II eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop analysiert werden.

### 4.3.4. Immunhistochemische Färbung

FaDu-Zellen und Gewebe von Kopf- und Halstumorpasienten wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert.

Dabei wurde der gefrorene Gewebeschnitt 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Hilfe eines Wachsstiftes ein Hof um die Probe auf dem Objektträger eingezeichnet. Nach einer 20-minütigen Fixierung in 3% Paraformaldehyd, wurden die Schnitte kurz mit Tris Base (TBS) gewaschen und in TBS, das 5% BSA und 0,2% Triton X-100 enthielt, für 30 min blockiert und permeabilisiert. Die Schnitte wurden mit dem primären Antikörper in TBS mit 5% BSA

über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Objektträger wurde am Folgetag dreimal mit TBS gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriff mit TBS konnte die Probe mit Vectashield und Deckgläsern fixiert und unter dem Mikroskop analysiert werden.

Als primäre Antikörper wurden 1 µg/ml anti-EpCAM, 2,7 µg/ml anti-MIF IgG und 4 µg/ml Kaninchen anti-CD45 IgG verwendet und wie oben beschrieben inkubiert. Die Doppelfärbungen wurden mit MIF zusammen mit entweder EpCAM oder CD45 durchgeführt.

Zur Detektion setzte man die beiden sekundären Antikörper 5 µg/ml Schwein anti-Kaninchen IgG-FITC und 2,8 µg/ml Ziege anti-Maus IgG-Cy3 für 30 min bei 37°C im Dunklen ein. Anschließend konnte die Probe bedeckt und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

Zur Analyse der MIF Expression und Freisetzung aus FaDu-Zellen, werden diese Zellen nach Fixierung und Permeabilisierung mit 2,7 µg/ml Kaninchen anti-MIF IgG für 45 min bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend 30 mit 5 µg/ml anti-Kaninchen IgG-FITC bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Visualisierung des Zellkerns wurde 7-AAD 1:100 benutzt.

### 4.4. Migration von Granulozyten

Unter Zellmigration versteht man die aktive Ortsveränderung von Zellen. Handelt es sich um eine gezielte, zu einem Stimulus gerichtete Bewegung, so spricht man von Chemotaxis. Die eingesetzte Zellkonzentration der Granulozyten betrug  $5 \times 10^5$  Zellen pro 200 µl. Es wurden 24-Well Platten verwendet.

Im Chemotaxis-Assay wurde die gerichtete Wanderung der Granulozyten in Richtung FaDu-Kulturüberstand und den darin enthaltenen Substanzen untersucht. Für die Chemotaxis pipettierte man zunächst 800 µl FaDu-Kulturüberstand oder Kulturmedium ohne sowie mit Iso-1 bzw. DMSO in die wells. Ein Transwell mit einer Porengröße von 3 µm wurde eingebracht und 200 µl Kulturmedium-Zellsuspension in dessen obere Kammer gegeben.

Bei der Chemotaxis ließ man die Granulozyten 3 Stunden bei 37°C wandern, nahm die Transwells heraus und zählte die durchgewanderten Zellen mit dem Casy-Counter.

#### 4.5. Sandwich-ELISA für MIP-1 $\beta$

Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) stellen eine quantitative Methode zum Nachweis ausgewählter Moleküle dar. Das Prinzip beruht auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion dar. Durch den Vergleich mit dem Standard kann am Ende durch die Intensität der Nachweisreaktion die Menge des betreffenden Proteins in der jeweiligen Probe quantifiziert werden.

Zum Nachweis des gewählten Zytokins wurde zunächst eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Fänger-Antikörper gegen MIP-1 $\beta$  beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert, am Folgetag dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Platte 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit dem Standard und den Proben inkubiert, dreimal gewaschen und mit 9  $\mu\text{g/ml}$  biotinyliertem Nachweisantikörper beschichtet. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde fünfmal gewaschen und schließlich 30 min mit Streptavidin-markierter Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase) in der vom Hersteller vorgegebenen Konzentration inkubiert. Anschließend wurde die Platte zehn Mal gewaschen und mit 100  $\mu\text{l}$  TMB-Substrat versehen. Nach ungefähr 15 min Umsetzung des Substrats wurde die enzymatische Reaktion durch Hinzugabe von 1 M Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$  gemessen.

#### 4.6. Gelatine-Zymographie zur Detektion von Matrixmetalloproteasen

Die Gelatine-Zymographie ist eine spezifische Methode zum Nachweis der Aktivität von Matrixmetalloproteasen. Sie basiert auf einer Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), wobei die durch das Gel wandernden Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen sind und ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur herkömmlichen SDS-PAGE enthält das mit Coomassieblau gefärbte Zymographie-Gel zusätzlich Gelatine, die als Substrat für die Matrixmetalloproteasen dient. So können die durch das Gel wandernden Proben, sofern sie die Gelatinasen (MMP-2, MMP-9) enthalten, das Substrat enzymatisch abbauen. Wird die Gelatine abgebaut, so bilden sich in dem ansonsten blau gefärbten Gelatinegel helle Banden, die auf die Aktivität der Gelatinasen hinweisen.

Für die hier durchgeführte Zymographie wurde ein Trenngel mit 8,5% Acrylamid, 0,2% Gelatine, 8% Page A, 0,1% SDS, 83,1% H<sub>2</sub>O und 1,5 mM Temed hergestellt. Zur Polymerisation wurde 0,015% Ammoniumpersulfat (APS) verwendet. Das Gel wurde in den

Gießstand gegeben und mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, konnte das Sammelgel aufpipettiert werden. Zu dessen Herstellung verwendete man 5% Acrylamid, 4,17% Page B, 0,1% SDS, 90,82% H<sub>2</sub>O, 2 mM Temed und 0,02% APS. Zur Bildung der für die Proben gewünschten Taschenanzahl wurde ein Kamm vorsichtig in das Gel eingeführt und bis zur vollständigen Auspolymerisation des Gels darin belassen. Um das Gel wurde Laemmli-Puffer eingefüllt und die Taschen mit einer Spritze gesäubert. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 in Zymogram Probenpuffer gelöst und in die Taschen eingefüllt. Der Probenpuffer setzte sich zusammen aus 0,4 M Tris, 5% SDS, 20% Glycerol sowie 0,03% Bromphenolblau und lag bei einem pH von 6,8. Die Elektrophorese lief 2 Stunden bei einer Stromstärke von 20 mA, wobei die Proben nun das Gel durchwandern konnten. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel zur Entfernung des SDS 1 Stunde in 2,5% Triton X-100 gewaschen. Danach wurde das Gel für 16 Stunden bei 37°C (optimale Bedingungen für die enzymatische Wirkung der Gelatinasen) in Zymogram-Inkubationspuffer inkubiert. Der Zymogram-Inkubationspuffer enthielt 50 mM Tris mit einem pH von 7,5, 200 mM SDS, 20 %NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 1% Triton X-100. Es schloss sich eine zweistündige Färbung mit 0,5% Commassieblau, 30% Methanol und 10% Essigsäure an. Es folgte eine Entfärbung mit 30% Methanol und 10% Essigsäure für 30 min, 1 Stunde und 6 Stunden bis die Banden sichtbar wurden.

## 5. ERGEBNISSE

### 5.1. MIF-Expression bei Kopf- und Halstumoren

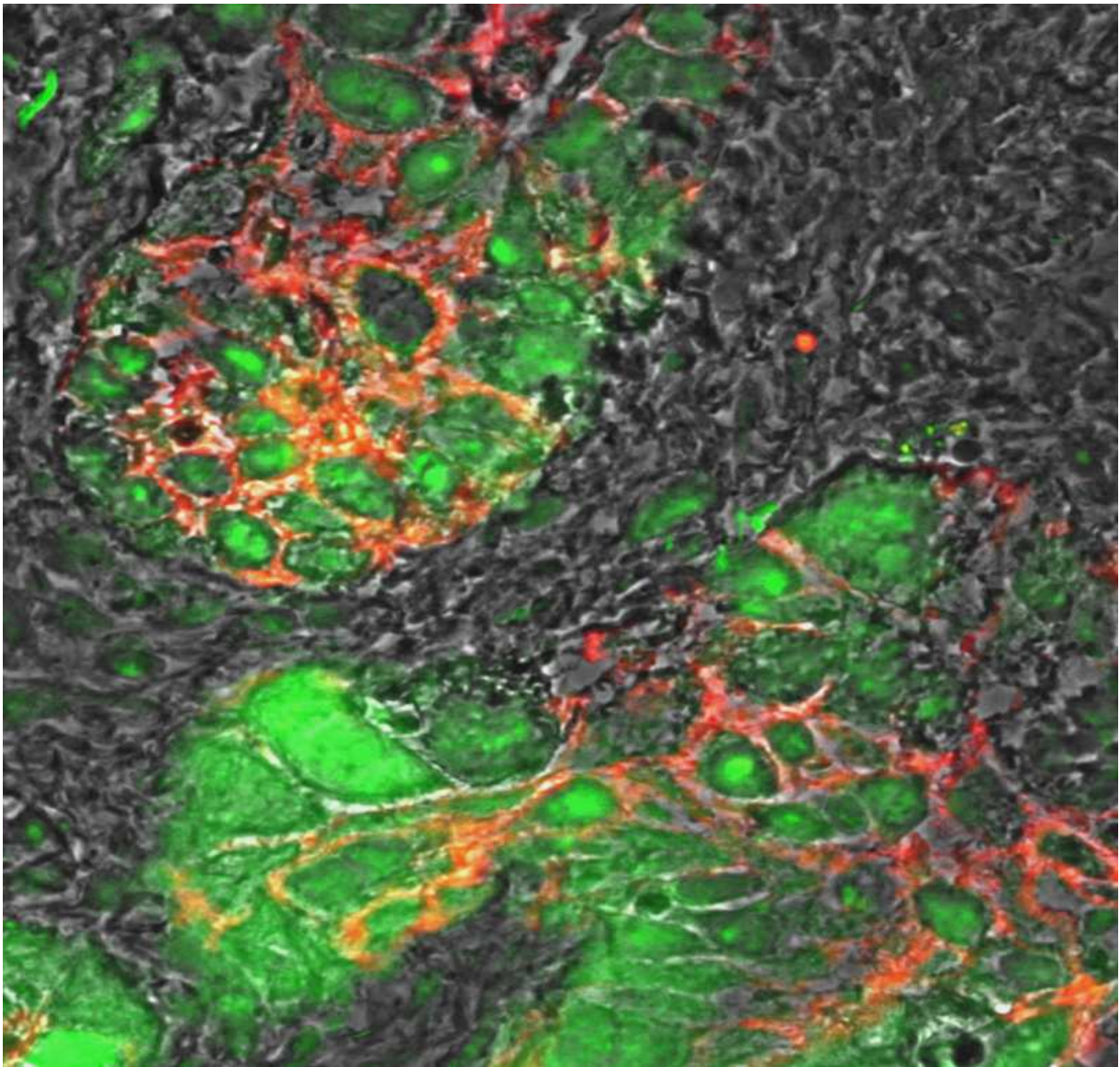
#### 5.1.1. MIF-Expression im Gewebe von Patienten mit Kopf- und Halstumoren

MIF wird in verschiedenen Tumoren und deren Vorstufen, einschließlich Prostata-, Kolon-, Bronchial-, hepatozellulärem Karzinom, Glioblastom und malignem Melanom, exprimiert.

Ziel dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, ob MIF auch in Kopf- und Halstumoren exprimiert wird und welche Rolle es bei der Interaktion von Kopf- und Halstumoren mit Granulozyten spielt. Dazu wurde zunächst die Expression von MIF in Kopf- und Halstumoren anhand von Gefrierschnitten immunhistochemisch untersucht. Als Marker der Tumorzellen wurde EpCAM gewählt. EpCAM ist ein pan-epitheliales Differenzierungsantigen und ist in epithelialen Tumorzellen überexprimiert. Da Immunzellen oft das Tumorgewebe infiltrieren, wurde zusätzlich eine Doppelfärbung von MIF und CD45 durchgeführt. Letzteres wird von Leukozyten ubiquitär exprimiert und bietet sich somit als Leukozytenmarker an.

Bei dem analysierten Gewebe der Kopf- und Halstumorpatienten handelte es sich um Hypopharynx-, Zungengrund und Larynxkarzinome, also um Tumore epithelialen Ursprungs. Phasenkontrastanalysen von Gewebeschnitten 6 verschiedener Kopf- und Halstumorpatienten zeigten eine deutliche Expression von MIF. Generell lassen sich im Phasenkontrast Stroma und davon deutlich abgegrenzt Tumorinseln erkennen. Das Stroma setzt sich aus Blutgefäßen, Fibroblasten und extrazellulärer Matrix zusammen. Die Tumorinseln bestehen aus entarteten Epithelzellen, deren Kern-Plasma-Verhältnis deutlich zum Kern hin verschoben ist. Außerdem herrscht bei Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen eine erhöhte Zell- und Kernformvarianz mit vermehrter Unregelmäßigkeit.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass EpCAM positive Zellen, also Tumorzellen, Zellnester innerhalb des Gewebes bildeten (Abbildung 5). Die überwiegende Mehrzahl EpCAM positiver Zellen war deutlich positiv für MIF, wobei sich die MIF positiven Zellen überwiegend am Rand der Tumorinseln befinden. Eine Subpopulation EpCAM positiver Zellen, die im Zentrum der Tumorinseln lagen, war negativ für MIF. In den Tumorinseln waren einige wenige Zellen zu finden, die weder MIF noch EpCAM exprimierten. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Stroma, also Blutgefäße und Fibroblasten (Abbildung 5). Insgesamt lässt sich sagen, dass in allen analysierten Kopf- und Halstumoren MIF, welches von Tumorzellen synthetisiert wurde, nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 5: Colokalisation von MIF und EpCAM positiven Tumorzellen**

Das gezeigte Fluoreszenzbild ist repräsentativ für 6 analysierte Gewebeschnitte. EpCAM positive Zellen sind rot und MIF positive Zellen grün dargestellt. Die Farbe orange ergibt sich aus Überlagerung EpCAM positiver und MIF positiver Zellen und spricht für eine Colokalisation dieser beiden Proteine in den Tumorsinseln.

Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob MIF auch von tumorassoziierten Leukozyten exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurden Doppelfärbungen von MIF und CD45 bei 10 Tumorpatienten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle Tumorsinseln (erkennbar an der Größe und Unregelmäßigkeit der Zellkerne im Phasenkontrast) MIF positive Zellen aufwiesen. In den meisten Tumoren siedelte sich eine große Anzahl tumorassoziierter Leukozyten am äußeren Rand der Tumorsinseln an. Allerdings gab es auch einige wenige Schnitte, bei denen die Leukozyten bis ins Zentrum der Tumorsinseln vorgedrungen waren.

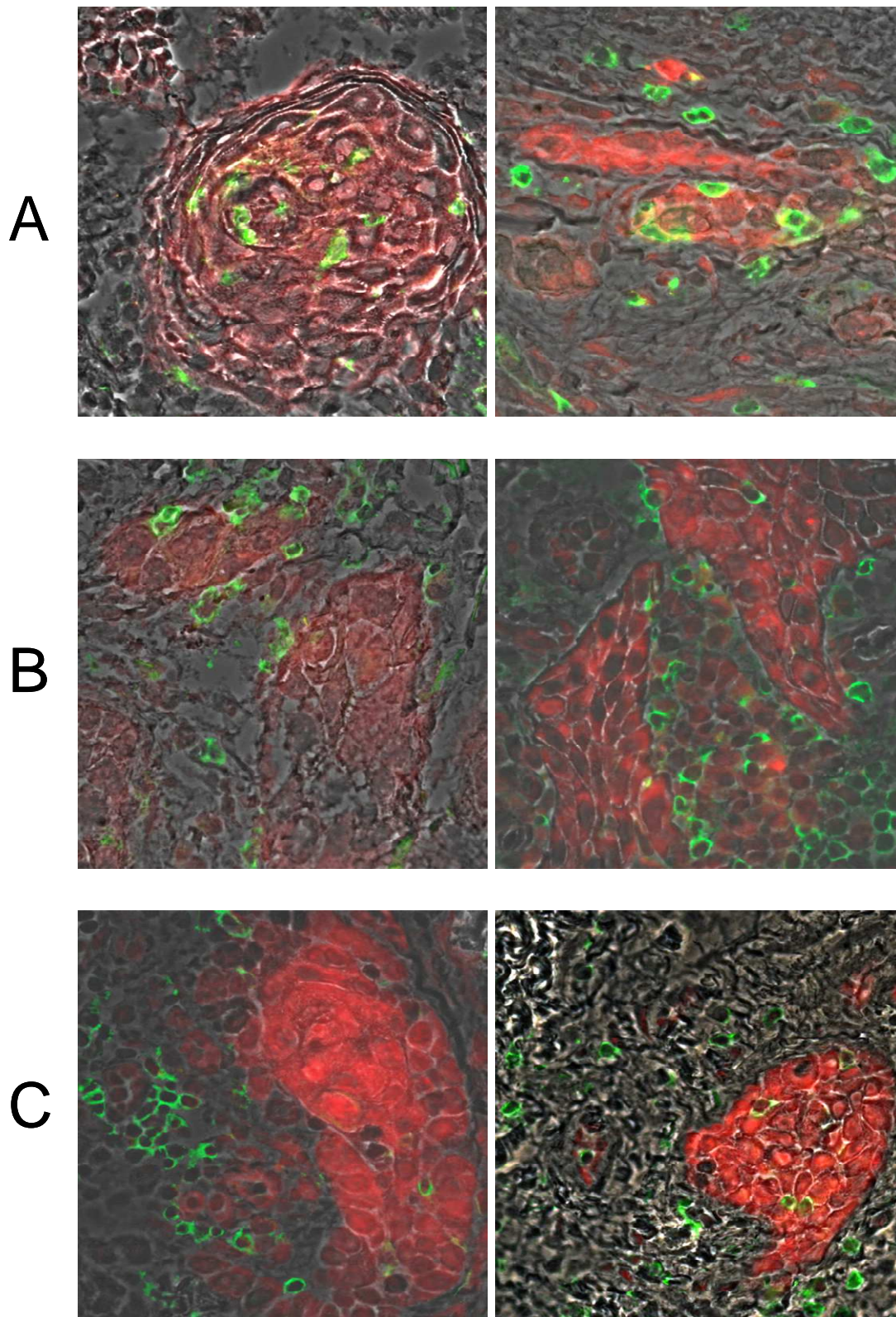
Die Lokalisation der Leukozyten kann in den gefärbten Schnitten in drei Gruppen unterteilt werden. Bei einem Teil der analysierten Gewebeschnitte wurden die Leukozyten überwiegend



im Zentrum der MIF positiven Zellnester gefunden (Gruppe A). Weiterhin wurden Schnitte analysiert, bei denen die Leukozyten eher am Rand der MIF positiven Zellnester zu finden waren (Gruppe B). In Gruppe C befand sich die überwiegende Mehrzahl der Leukozyten außerhalb der MIF positiven Zellnester, also im Stroma.

In den Gefrierschnitten der Kopf- und Halstumoren konnte keine Überlagerung von MIF- und CD45-positiven Zellen festgestellt werden (Abbildung 6). Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass tumorassoziierte Leukozyten nicht bei der Produktion von MIF im Tumormilieu beteiligt sind, ihre Akkumulation im Tumorgewebe könnte jedoch auf einen Einfluss des tumoralen MIF auf die Chemotaxis von Leukozyten hinweisen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIF vorwiegend in Tumorzellen exprimiert wird und die Sekretion von MIF zu einer Infiltration von Leukozyten führen könnte.



**Abbildung 6: Keine Colokalisation von MIF und CD45 positiven Leukozyten**

Die gezeigten Fluoreszenzbilder sind repräsentativ für 10 analysierte Gewebeschnitte. CD45 positive Zellen sind grün und MIF positive Zellen rot dargestellt.

In Gruppe **A** sind die Leukozyten innerhalb der Zellnester MIF positiver Zellen zu finden.

Gruppe **B** beinhaltet Leukozyten am Rand der MIF positiven Zellnester.

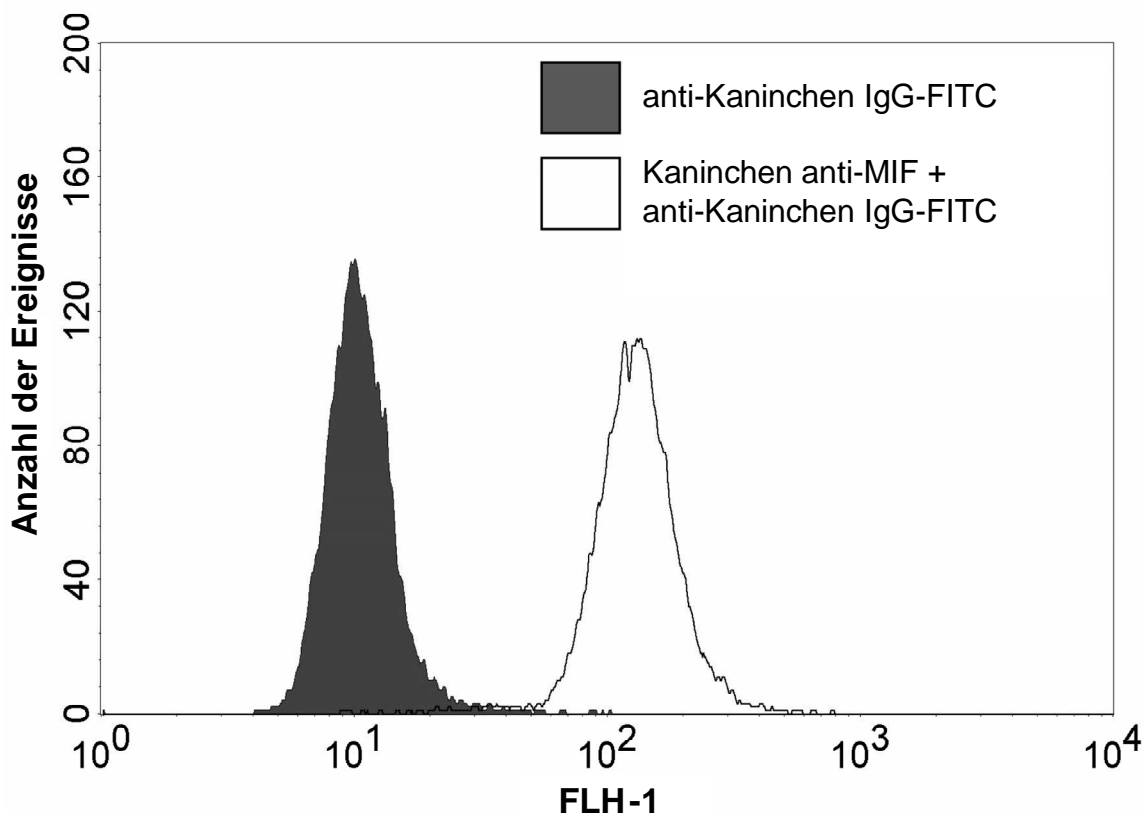
Gruppe **C** zeigt Leukozyten außerhalb der Zellnester MIF positiver Zellen.

Es findet sich eine große Anzahl von tumorassoziierten Leukozyten am Rand der Tumorinseln, die jedoch nicht MIF positiv gefärbt sind. Die Leukozyten können somit nicht der Ursprung der hohen MIF-Konzentrationen im Tumorgewebe sein.

### 5.1.2. MIF-Expression und -Freisetzung durch FaDu-Tumorzellen

In den vorherigen Experimenten konnte *in situ* die Expression von MIF in Kopf- und Halstumoren nachgewiesen werden. In weiteren Versuchen sollte der Einfluss von MIF aus Tumorzellen auf die Funktion von Granulozyten untersucht werden. Hierfür wurde ein *in vitro* Modell mit der humanen Zelllinie FaDu, welche aus einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx isoliert wurde, etabliert. FaDu wurde zunächst auf ihre MIF-Expression und -Freisetzung hin charakterisiert.

Zum durchflusszytometrischen Nachweis der MIF-Expression wurden die FaDu-Zellen mit dem primären und sekundären Antikörper gefärbt. Die Signalüberlagerung der Kontrolle und der spezifischen Färbung zeigte eine deutliche Expression von MIF in FaDu-Zellen (Abbildung 7).

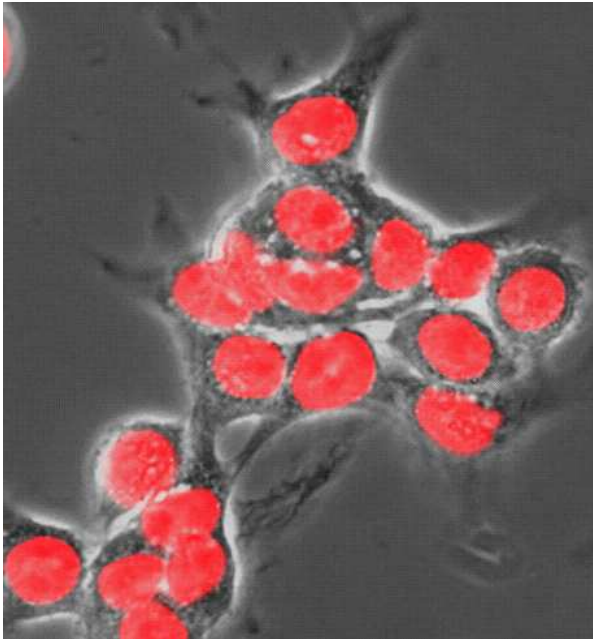


**Abbildung 7: FaDu-Zellen exprimieren MIF**

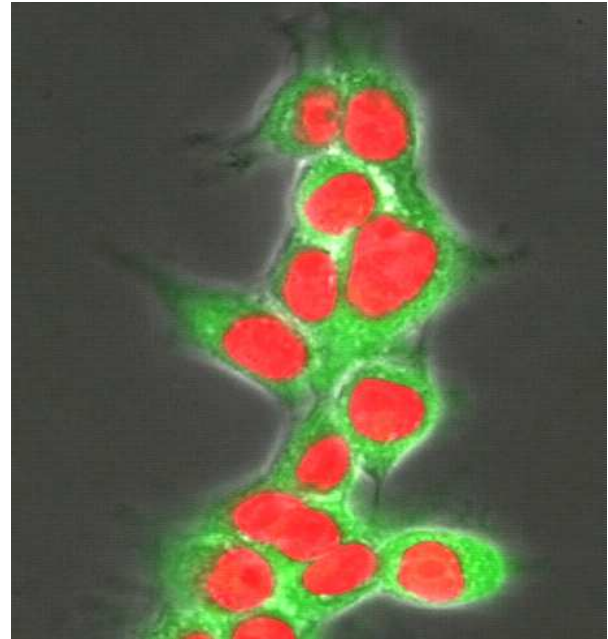
Die FaDu-Zellen werden fixiert sowie permeabilisiert, für 45 min mit dem Primär- und für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Quantifizierung erfolgt unmittelbar mittels Durchflusszytometer.

Zur weiteren Charakterisierung der MIF-Expression wurden FaDu-Zellen auf einem Deckglas über Nacht kultiviert, mit primärem anti-MIF-Antikörper und 7AAD inkubiert, anschließend mit dem sekundären FITC-markierten Antikörper gefärbt und schließlich unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es konnte deutlich eine zytoplasmatische Lokalisation von MIF in FaDu-Zellen festgestellt werden (Abbildung 8).

## Sekundärer Antikörper



## anti-MIF-Antikörper Sekundärer Antikörper



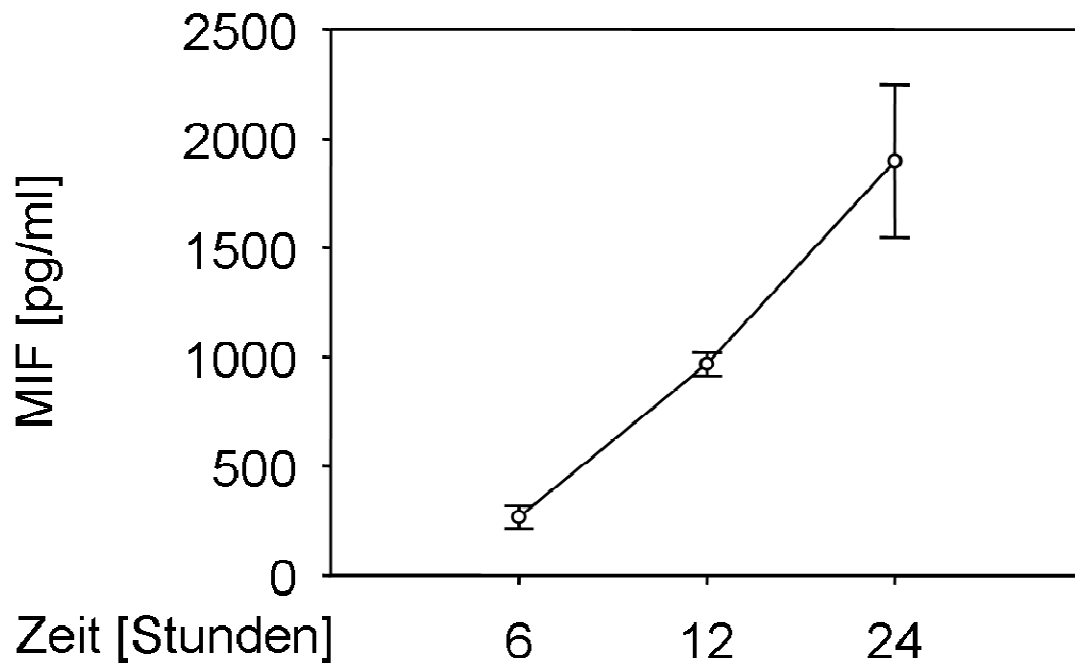
FaDu-Zellen wurden auf Deckgläsern über Nacht kultiviert. Zellen wurden fixiert sowie permeabilisiert und mit dem Primärantikörper für 45 min und anschließend mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper (grün) für 30 min gefärbt. Zur Visualisierung der Kerne diente 7AAD (rot). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigt eine starke intrazelluläre Expression von MIF in FaDu-Zellen.

Linkes Bild: sekundärer Antikörper allein (als Kontrolle)

Rechtes Bild: Primärer und sekundärer Antikörper

Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

Anschließend musste untersucht werden, ob FaDu-Zellen das produzierte MIF auch sezernieren und somit für die angestrebten *in vitro* Experimente geeignet sind. Die Quantifizierung der MIF-Sekretion aus FaDu-Zellen erfolgte mit Hilfe eines Sandwich-ELISA. Dafür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in Kulturmedium inkubiert, nach 6, 12 und 24 Stunden der Überstand abgenommen und mittels ELISA die MIF Menge gemessen. Es konnte nachgewiesen werden, dass FaDu-Zellen MIF in einer zur Inkubationszeit proportional steigenden Menge in den Überstand sezernieren (Abbildung 9).



**Abbildung 9: MIF Freisetzung von FaDu-Zellen steigt zeitabhängig**

FaDu-Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen/ml) werden in Kulturmedium inkubiert. Die Überstände werden nach 6, 12 und 24 Stunden abgenommen und die MIF-Konzentration mittels ELISA gemessen. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Erstmalig konnte somit das MIF-Expressions- und MIF-Sekretionsverhalten bei FaDu-Zellen dargestellt werden.

Der aus der 24-Stunden-Inkubation stammende FaDu-Kulturüberstand, der 2 ng/ml MIF enthielt, wurde für die nachfolgenden Experimente verwendet.

## 5.2. Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf Granulozytenmigration

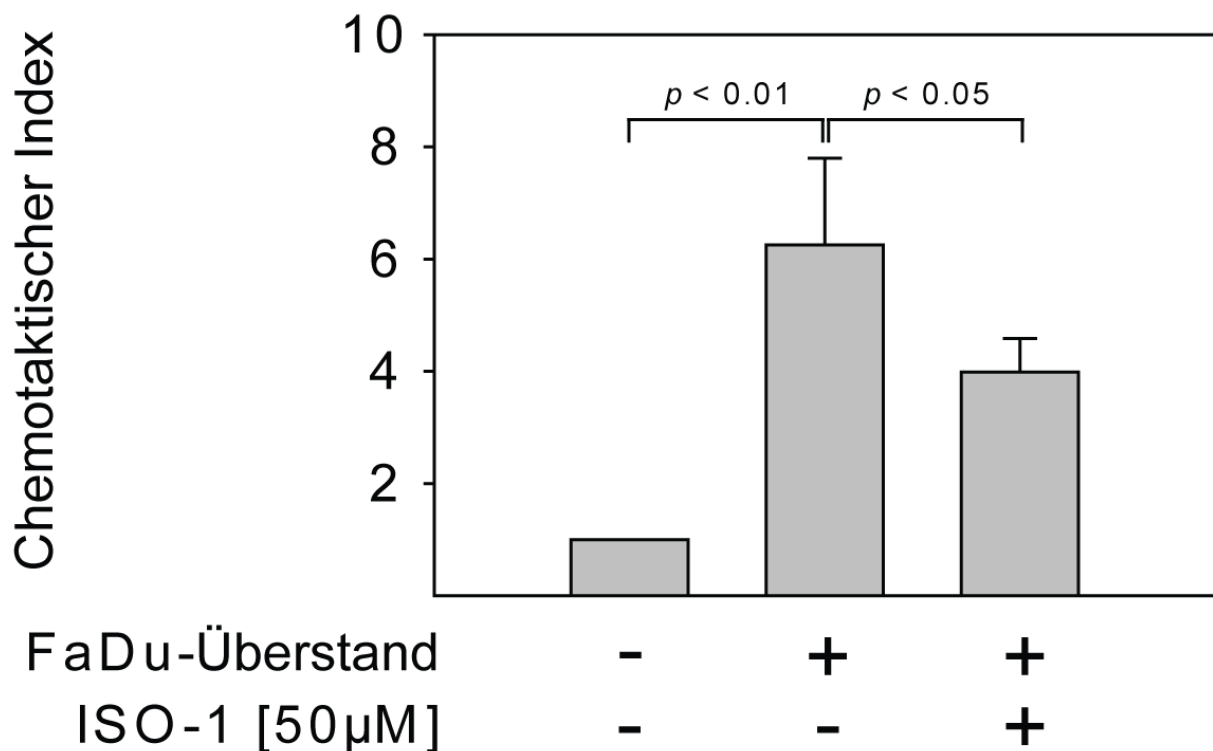
Granulozyten besitzen die Fähigkeit sich sowohl auf chemokinetische (zufällige) als auch chemotaktische (gerichtete) Weise zu bewegen. Tumore können Faktoren ausschütten, welche die gerichtete Migration beeinflussen und Granulozyten anlocken. Da Granulozyten von allen Immunzellen des Blutes die größte Migrationsfähigkeit besitzen, ist es von außerordentlichem Interesse, den Einfluss von MIF aus Tumorzellen auf die Migrationsbereitschaft der Granulozyten zu untersuchen.

Als Nachweis dafür, dass die Effekte der Chemotaxis spezifisch von MIF abhängig waren, wurde der MIF-Inhibitor Iso-1 verwendet. Iso-1 verhindert die Dopachrom-Tautomerase-Aktivität von MIF durch Bindung an dessen katalytisch aktives Zentrum.



Für die gerichtete Migration wurden in die unteren wells 800 µl FaDu-Kulturüberstand mit oder ohne 50 µM Iso-1 pipettiert und als Kontrolle Kulturmedium mit oder ohne Iso-1 verwendet. Da das Iso-1 in DMSO gelöst war, wurde bei Verwendung von Iso-1 immer DMSO in jeweils identischer Konzentration als zusätzliche Kontrolle eingesetzt. In die Transwells brachte man die in Kulturmedium suspendierten Granulozyten ein, inkubierte für 3 Stunden bei 37 °C und zählte anschließend die Granulozyten, die durch die Transwells migriert waren, mittels Casy-Counter.

FaDu-Kulturüberstand konnte hierbei die gerichtete Migration der Granulozyten signifikant induzieren. Bei Anwesenheit von Iso-1 wird diese Chemotaxis signifikant gehemmt (Abbildung 10). Die zum FaDu-Kulturüberstand gerichtete Migration der Granulozyten ist somit von MIF abhängig.



**Abbildung 10: FaDu-Kulturüberstand induziert MIF-abhängig die gerichtete Migration von Granulozyten**

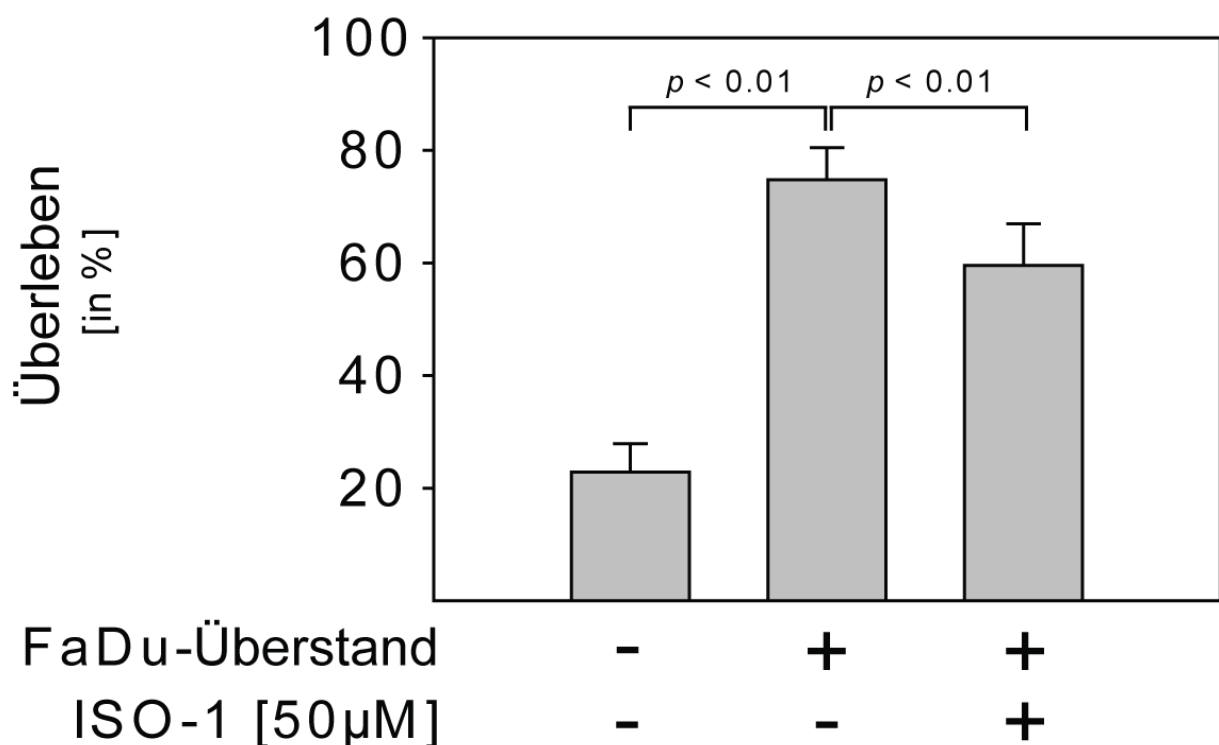
Für die Bewertung der gerichteten Granulozytenmigration wurden 3 µm Zellkultur-Einsätze mit passenden 24-well-Platten verwendet. Die 24-well-Platten wurden mit 800 µl FaDu-Kulturüberstand ± Iso-1 gefüllt, die 3 µm Zellkultureinsätze positioniert und die Granulozyten in einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen in 200 µl Kulturmedium in die Zellkultureinsätze eingebracht. Nach 3 Stunden Migration bei 37°C wurden die in das untere well gewanderten Granulozyten mit dem CASY-Counter gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0.05$  und  $p < 0.01$  bestimmt (Student's *t*-test).

Das vom Tumor produzierte MIF kann potent Neutrophile anlocken und könnte somit *in vivo* ihre Migration in tumorales Gewebe fördern.

### 5.3. Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf das Überleben der Granulozyten

MIF kann das Überleben von Granulozyten verlängern und somit modulatorisch in das Immunsystem eingreifen (Baumann et al., 2003). Die Rolle von MIF auf Überleben und Apoptose von Granulozyten sollte im hier etablierten *in vitro* Kopf-Halstumormodell überprüft werden. Hierfür wurden Granulozyten in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit FaDu-Kulturüberstand resuspendiert und nach Zusatz von 50  $\mu$ M Iso-1 für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurden auch Ansätze mit Kulturmedium ohne sowie mit Zusatz von Iso-1 bzw. DMSO in jeweils identischer Konzentration verwendet. Anschließend wurden die Granulozyten mit 7-AAD und Annexin-V-PE je 1:100 für 20 min bei 25°C im Dunkeln inkubiert und mit dem Durchflusszytometer analysiert.

Die Inkubation der Granulozyten im FaDu-Kulturüberstand konnte ihre Spontanapoptose dramatisch reduzieren. Iso-1 hemmte zwar die antiapoptotische Wirkung von FaDu-Kulturüberstand signifikant, jedoch lediglich um ca. 15% (Abbildung 11).



**Abbildung 11: MIF im FaDu-Kulturüberstand ist kein dominanter Faktor für das Überleben von Granulozyten**

Granulozyten wurden mit FaDu  $\pm$  50 $\mu$ M Iso-1 für 24 Stunden bei 37°C stimuliert. Granulozyten wurden mit Annexin V-PE/7AAD gefärbt und mittels Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0.01$  bestimmt (Student's *t-test*).

Daraus lässt sich schließen, dass MIF eine untergeordnete Rolle bei der Apoptose von Granulozyten spielt und andere Faktoren, die im FaDu-Kulturüberstand enthalten sind, einen wesentlich stärkeren lebensverlängernden Effekt auf Granulozyten besitzen.

## 5.4. Effekte von FaDu-Kulturüberstand auf Granulozyten-aktivierung

### 5.4.1. Effekte von FaDu-Kulturüberstand auf Granulozytengranula

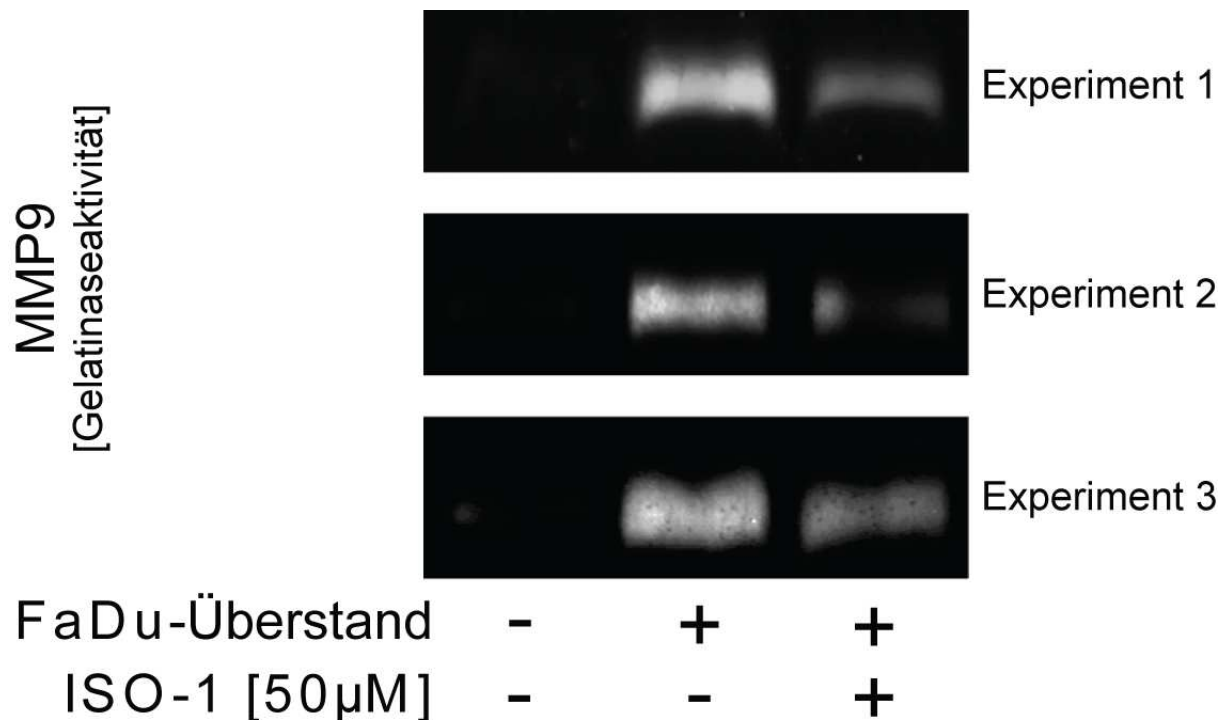
#### 5.4.1.1. Effekte von FaDu-Kulturüberstand auf Matrixmetalloproteasen (MMP) in Granulozyten

Matrixmetalloproteasen sind zinkhaltige Enzyme, die für den Abbau und Umbau extrazellulärer Matrix im malignen Gewebe verantwortlich sind. Besonders für die Neoangiogenese und die Metastasierung von Tumoren scheinen diese Enzyme von erheblicher Bedeutung zu sein (Karahan et al., 2007). MMP-2 und MMP-9 werden in tertiären Granula der Granulozyten produziert und sind von großem Interesse, da sie sowohl den Abbau der Basalmembran und somit die Metastasierung unterstützen als auch den Umbau tumoreigener Blutgefäße fördern. Aus diesen Gründen wurde der Effekt von tumoralem MIF auf die MMP-2- und MMP-9-Aktivität in Granulozyten mittels Gelatine-Zymographie untersucht. Bei der Zymographie handelt es sich um eine modifizierte SDS-Gelelektrophorese, bei der Gelatine als Substrat für die Aktivitätsanzeige von Matrixmetalloproteasen dient, da besonders MMP-2 und MMP-9 als Gelatinase A und B die Gelatine umsetzen.

Zunächst wurden die Granulozyten in einer Konzentration von  $0,1 \times 10^6$  Zellen/0,1 ml für 1 Stunde mit FaDu-Kulturüberstand mit und ohne Anwesenheit von 50  $\mu$ M Iso-1 inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit Kulturmedium ohne sowie mit Zusatz von Iso-1 bzw. DMSO in jeweils identischer Konzentration.

Nach Inkubation der Granulozyten in Kulturmedium sind keine Bande und damit keine Umsetzung der Gelatine zu beobachten. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Inkubation der Granulozyten in FaDu-Kulturüberstand die Aktivität von MMP-9 in Granulozyten steigert und somit eine Visualisierung der Banden ermöglicht. Wurde die Stimulation in Anwesenheit von Iso-1 durchgeführt, war die Aktivität der Matrixmetalloprotease deutlich reduziert, was man anhand der Abnahme der Signalintensität erkennen konnte (Abbildung 12)





**Abbildung 12: FaDu-Kulturüberstand induziert MIF-abhängig die MMP-9-Aktivität in Granulozyten**

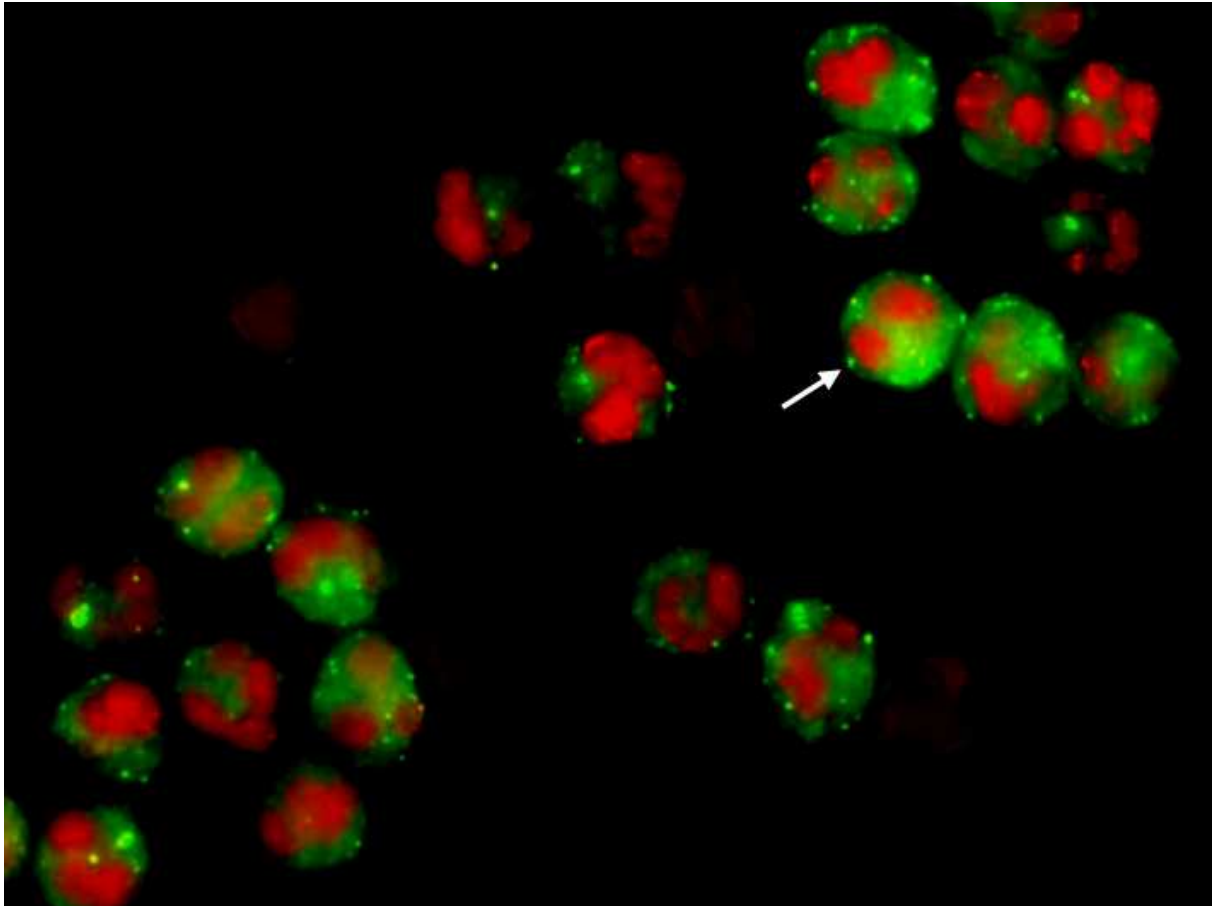
Granulozyten wurden für 1 Stunde in FaDu-Kulturüberstand  $\pm$  Iso-1 inkubiert. Die Überstände wurden in Zymogram-Probenpuffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE, welches 0,2 % Gelatine enthält, getrennt. Die Proben wurden renaturiert und es wurde zugelassen, dass die enzymatische Reaktion für 16 Stunden bei 37°C voranschreitet. Auf dem mittels Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gel sind die verdauten Proteine als weiße Banden sichtbar. Gezeigt sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MIF aus Tumorzellen die Aktivität von MMP-9 der Granulozyten induziert, was Tumorwachstum und Metastasierung begünstigt.

#### 5.4.1.2. Effekte von MIF auf die Lactoferrin-Produktion der Granulozyten

Lactoferrin ist in den sekundären Granula von Granulozyten gespeichert und kann auf Stimulation hin ausgeschüttet werden. Dieser Mediator dient mit seinen Eisenbindungsstellen der Eisenhomöostase. Einerseits besitzt Lactoferrin sowohl antimikrobielle als auch antitumorale Wirkungen. Andererseits macht die Tatsache, dass Lactoferrin das Überleben von Granulozyten verlängert und die Rekrutierung von Granulozyten aus dem Blut erhöht, dieses Molekül äußerst interessant für weitere Untersuchungen (Wong et al., 2009; de la Rosa et al., 2008). Um die Spezifität des anti-Lactoferrin Antikörpers in den Granula der Granulozyten zu testen wurde zunächst mittels Zytospins und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Analyse eine Kontrollfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Granulozyten fixiert und permeabilisiert, 45 min mit 1 µg/ml anti-Lactoferrin Kaninchen-IgG und anschließend 30 min mit 5 µg/ml Schwein anti-Kaninchen IgG-FITC bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Nach Inkubation mit 7-AAD zur Kernfärbung wurden

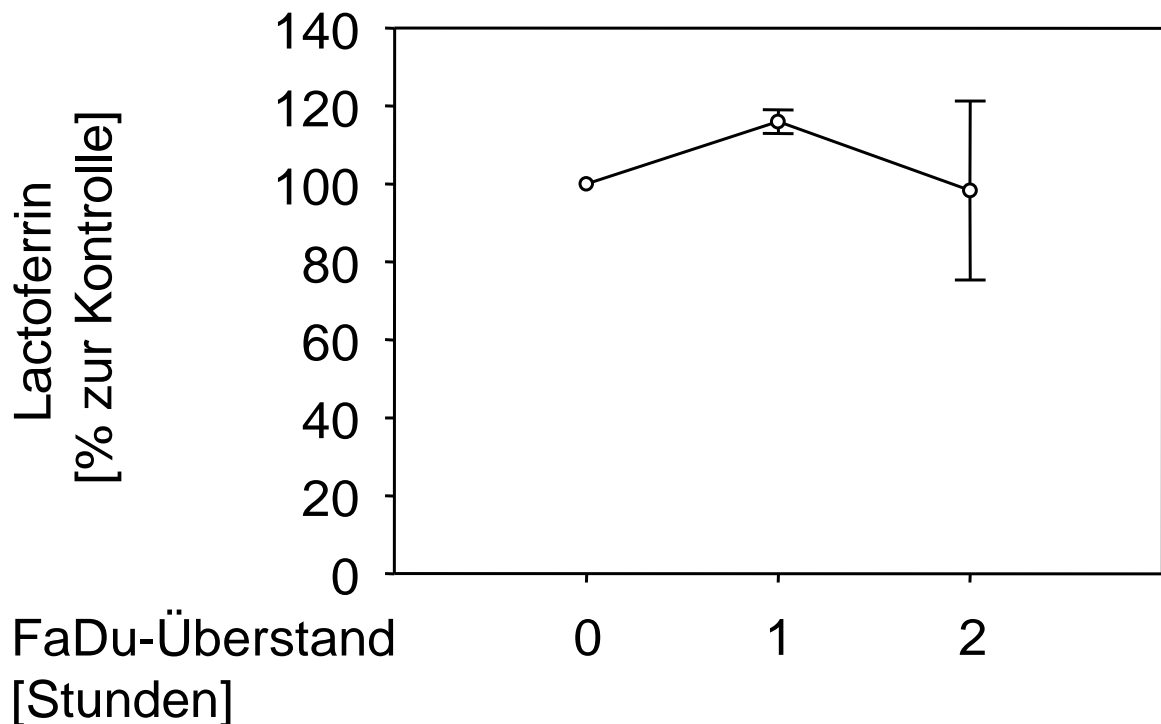
Zytospins angefertigt und die Zellen auf einem Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 13). Es zeigte sich, dass der Antikörper spezifisch Lactoferrin bindet, wodurch die Granula im Fluoreszenzmikroskop eindeutig grün erscheinen.



**Abbildung 13: Die Kontrollfärbung zeigt eine deutliche Expression von Lactoferrin in Granulozyten**

Granulozyten werden fixiert sowie permeabilisiert, mit 1 µg/ml anti-Lactoferrin Kaninchen-IgG für 45min, anschließend mit 5 µg/ml Schwein anti-Kaninchen IgG-FITC und 7-AAD für 30 min inkubiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Lactoferrin ist, in spezifischer Granula verpackt, deutlich grün zu erkennen (siehe Pfeil).

Als nächstes wurde der Einfluss von FaDu-Kulturüberstand auf die Lactoferrinexpression in den Granula von Granulozyten untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass nach 1 Stunde Inkubation der Granulozyten im FaDu-Kulturüberstand in den Granula mehr Lactoferrin exprimiert wurde als konstitutiv vorhanden war. Nach 2 Stunden war die Lactoferrinexpression wieder auf die konstitutive Menge gesunken, was darauf hinwies, dass das zuvor vermehrt produzierte Lactoferrin sekretiert worden war (Abbildung 14).

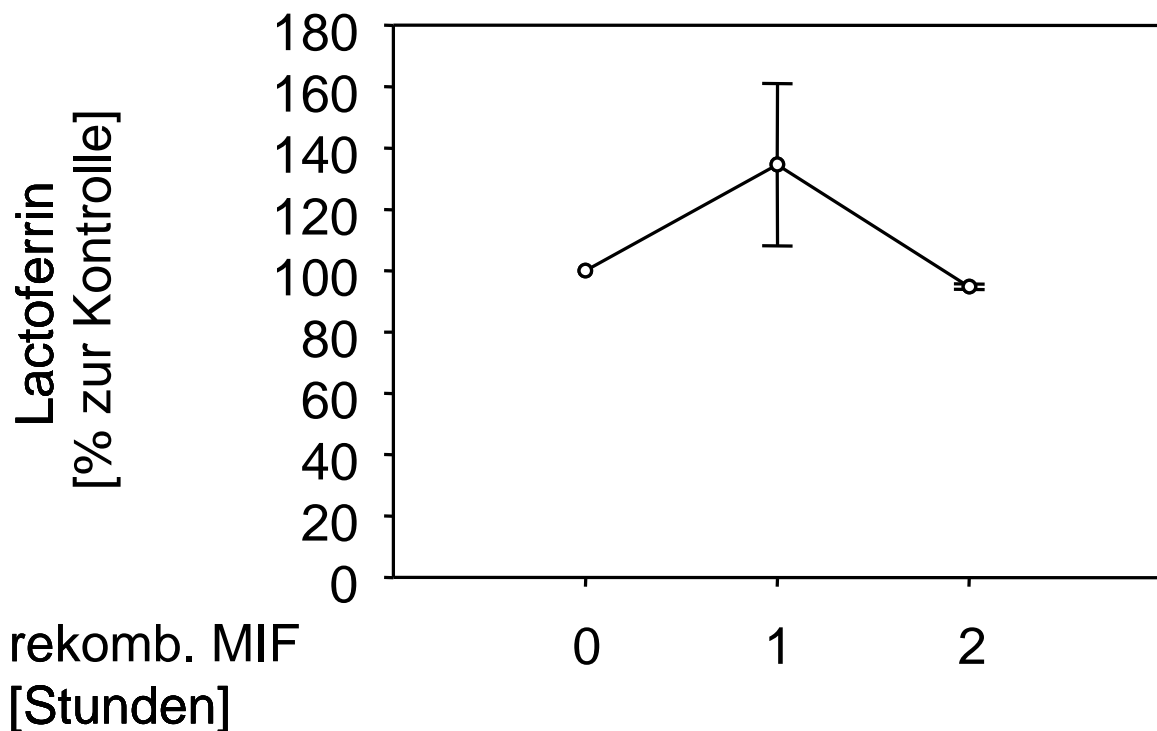


**Abbildung 14: FaDu-Kulturüberstand erhöht die intrazelluläre Lactoferrinkonzentration in Granulozyten**

Die Granulozyten werden im FaDu-Kulturüberstand für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Zellen werden fixiert sowie permeabilisiert, mit Biotin gekoppelten gegen Lactoferrin gerichtetem Antikörper gefärbt, gefolgt von APC-konjugiertem Steptavidin und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Es konnte somit gezeigt werden, dass Granulozyten im Tumormilieu vermehrt Lactoferrin produzieren können.

Welchen Einfluss speziell MIF auf die Lactoferrinproduktion in Granulozyten ausübt wurde mittels rekombinantem MIF untersucht. Ähnlich wie bei der Inkubation in FaDu-Kulturüberstand steigerten die Granulozyten nach 1 Stunde Stimulation mit rekombinantem MIF zunächst ihre Lactoferrinkonzentration, die ebenso nach einer weiteren Stunde unter den Ausgangswert absank (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Rekombinantes MIF erhöht die intrazelluläre Lactoferrin-konzentration in Granulozyten**  
 Die Granulozyten wurden mit 10 ng/ml rekombinantem MIF für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Zellen werden fixiert sowie permeabilisiert, mit Biotin gekoppeltem gegen Lactoferrin gerichtetem Antikörper gefärbt, gefolgt von APC-konjugiertem Steptavidin und mit dem Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten.

Diese Analogie in der Lactoferrinproduktion deutet darauf hin, dass die Effekte des FaDu-Kulturüberstandes ebenso von MIF abhängig sind.

#### 5.4.1.3. Effekt von FaDu-Kulturüberstand auf die Produktion reaktiver Sauerstoff-Intermediate (ROI) von Granulozyten

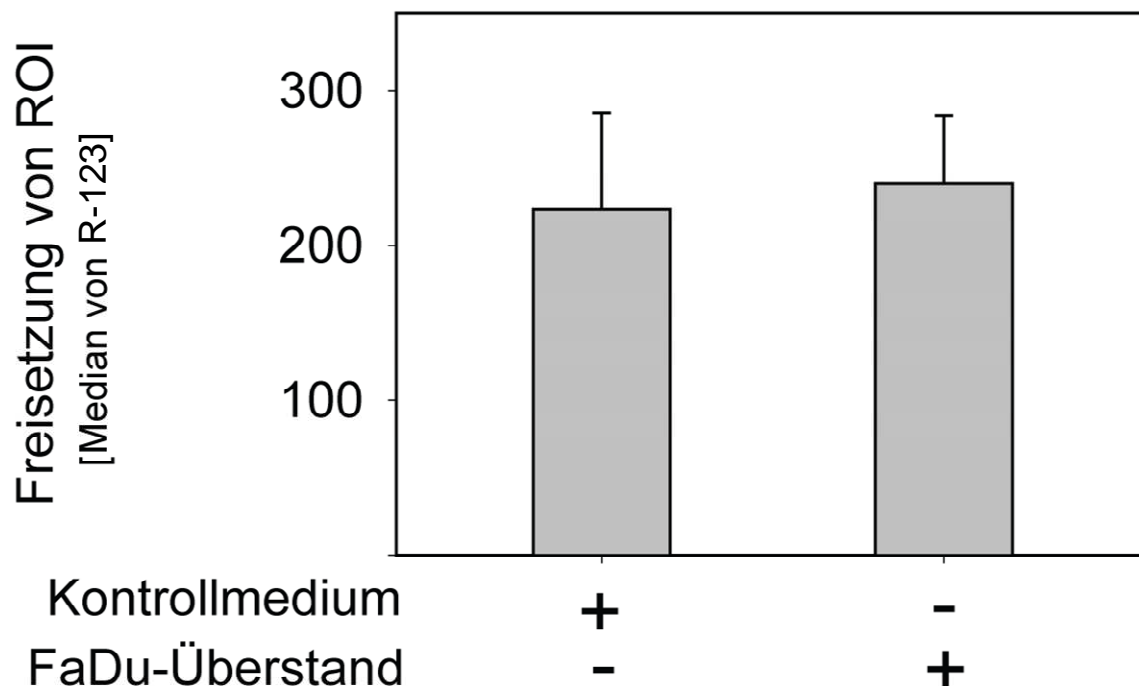
Es wurde gezeigt, dass sekretierte Myeloperoxidase (MPO) besonders bei der frühen Phase der Tumorentstehung beteiligt ist (Gross et al., 2009). MPO, ein Peroxidase-Enzym, wird in den azurophilen Granula der Granulozyten gespeichert. MPO setzt  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{Cl}^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{OCl}^-$  um. Das Hypochlorid-Anion, als reaktive Sauerstoffspezies, hat die Aufgabe Bakterien und andere Pathogene nach Phagozytose zu zerstören.

Die genaue Rolle von MPO im Tumormilieu ist bisher nicht bekannt, genauso wenig wie der Initiator, der die Freisetzung von MPO aus Granulozyten bewirkt. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Tumorzellen selbst durch Sekretion von MIF die Ausschüttung von MPO beeinflussen.

Die Aktivitätsmessung der ROI wird anhand der Umwandlung von Dihydrorhodamin-123 (DHR-123) in das fluoreszierende Rhodamin-123 (R-123) durch die gebildeten ROI überprüft.

Granulozyten wurden in FaDu-Kulturüberstand und in Kulturmedium als Kontrolle für 1 Stunde inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit DHR-123 bei 37 °C für 15 min, anschließend eine Inkubation auf Eis für 15 min zum Abstoppen der Reaktion und letztlich die durchflusszytometrische Messung von R-123.

FaDu-Kulturüberstand konnte die Konzentration an extrazellulären ROI nicht verändern. Weder MIF noch andere Faktoren des FaDu-Kulturüberstandes können ohne zusätzliche Stimuli zur Degranulation von ROI, also zur Aktivierung des oxidativen Weges der Granulozyten führen (Abbildung 16).



**Abbildung 16: FaDu-Kulturüberstand induziert nicht die Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Intermediate (ROI)**

0,1x10<sup>6</sup> Granulozyten werden mit 0,1 ml FaDu-Kulturüberstand ± 50 µM Iso-1 für 1 Stunde, anschließend 15min mit 25 µg/ml DHR-123 bei 37 °C und zum Schluss 15 min auf Eis inkubiert. R-123 wird durchflusszytometrisch gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten.

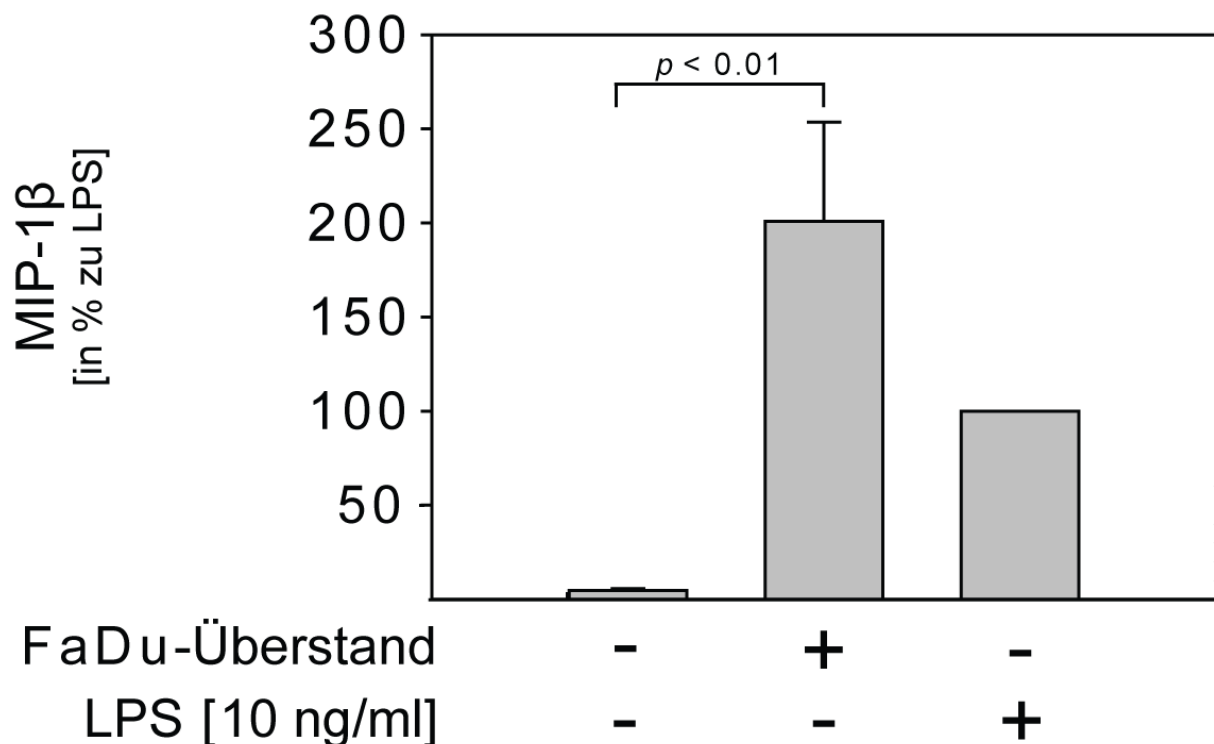
Es konnte somit gezeigt werden, dass MIF aus Tumorzellen die Freisetzung von reaktiven Sauerstoff-Intermediaten aus Granulozyten nicht regulieren kann.

#### 5.4.2. Effekte von FaDu-Kulturüberstand auf Chemokinsekretion von Granulozyten

Es ist bereits in der Literatur beschrieben, dass die Chemokinsekretion bei Tumorpatienten erhöht ist und dies einen wichtigen Einfluss auf Tumorwachstum und assoziierte Inflammation hat (Blum et al., 2008). Ein in diesem Zusammenhang wichtiges Chemokin ist MIP-1 $\beta$ , welches als proinflammatorisches Chemokin die Wanderung von Effektorzellen des Immunsystems moduliert (Dairaghi et al., 1998). Es ist bekannt, dass es nach Stimulation mit einem bakteriellen Endotoxin, wie LPS, von Granulozyten ausgeschüttet wird. Seine Rolle in der Tumorphagenese ist bis *dato* wenig beschrieben.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob MIF, welches aus Tumorzellen stammt, die Sekretion von MIP-1 $\beta$  induziert und somit zu einem chronischen Entzündungsprozess beitragen kann.

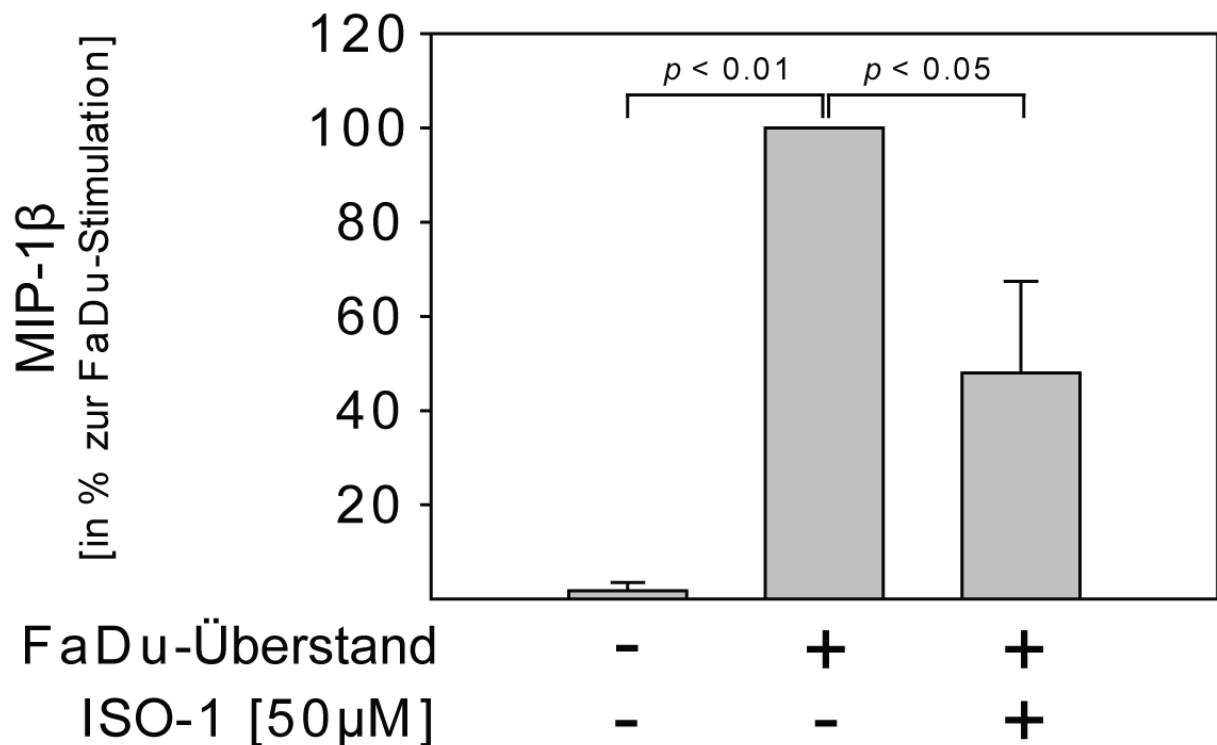
Granulozyten, mit einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml, wurden in FaDu-Kulturüberstand resuspendiert. LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml ist als gut charakterisierter Referenzstimulus etabliert und wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Kulturmedium diente dabei als Negativkontrolle. Anschließend wurden die Überstände nach 24 Stunden entnommen und auf das Vorhandensein von MIP-1 $\beta$  mittels ELISA überprüft. Das LPS steigert wie erwartet die Sekretion von MIP-1 $\beta$  aus Granulozyten (Abbildung 17). Überstand von FaDu-Zellen löste im direkten Vergleich eine deutlich stärkere MIP-1 $\beta$ -Sekretion aus als LPS.



**Abbildung 17: FaDu-Kulturüberstand induziert die MIP-1 $\beta$  Sekretion von Granulozyten stärker als LPS**  
 Granulozyten wurden für 24 Stunden in FaDu-Kulturüberstand inkubiert. Die Stimulation mit 10 ng/ml LPS wurde als ein Paradigma für Granulozytenaktivierung durchgeführt. Die Überstände werden mit ELISA analysiert. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0.01$  bestimmt (Student's *t-test*)

Als nächster Schritt musste getestet werden, ob die vermehrte Ausschüttung von MIP-1 $\beta$  durch MIF vermittelt wurde. Dazu wurden die Granulozyten mit FaDu-Kulturüberstand resuspendiert und anschließend wurde die Suspension mit 50  $\mu$ M Iso-1 inkubiert, die Überstände nach 24 Stunden entnommen und auf das Vorhandensein von MIP-1 $\beta$  mittels ELISA überprüft. Als Kontrollen wurden auch Ansätze mit Kulturmedium ohne sowie mit Zusatz von Iso-1 bzw. DMSO in jeweils identischer Konzentration verwendet.

Die Steigerung der MIP-1 $\beta$ -Sekretion durch FaDu-Kulturüberstand konnte durch Gabe von Iso-1 signifikant gesenkt werden. Die vermehrte Sekretion von MIP-1 $\beta$  kann also auf im FaDu-Kulturüberstand vorhandenes MIF zurückgeführt werden.



**Abbildung 18: MIF aus FaDu-Kulturüberstand induziert die MIP-1β Sekretion von Granulozyten**

Granulozyten wurden für 24 Stunden in FaDu-Kulturüberstand  $\pm$  50µM Iso-1 inkubiert. Die Überstände werden mit ELISA analysiert. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten gezeigt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0.01$  bestimmt (Student's *t*-test)

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Tumorzellen konditioniertes Zellkulturmedium neutrophile Granulozyten stärker aktiviert als bakterielles LPS. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MIF im Tumormilieu bei der Sekretionssteigerung proinflammatorischer Zytokine, wie MIP-1β, eine entscheidende Rolle spielt.

Die ermittelten Ergebnisse zeigen zusammenfassend, dass MIF aus Kopf- und Halstumorzellen die Migration von Granulozyten induziert, ihr Überleben verlängert, ihre Synthese von MMP-9 und Lactoferrin stimuliert und zur Sekretion des proinflammatorischen Zytokins MIP-1β aus Granulozyten führt.



## 6. DISKUSSION

### 6.1. Diskussion der Methoden

#### 6.1.1. MIF-Blockade durch Iso-1

In der vorliegenden Arbeit wurde Iso-1 für die Inhibition der MIF-Aktivität verwendet. Es ist bereits nachgewiesen, dass der enzymatische Bestandteil des MIF-Proteins eine wichtige Rolle für seine Funktion spielt (Lubetsky et al., 2002). Iso-1 ist eine Isoxalinverbindung, für die die Zellmembran durchlässig ist. Es inhibiert spezifisch die Dopachrom-Tautomeraseaktivität von MIF, indem es an das katalytisch aktive Zentrum von MIF bindet. Iso-1 kann die Bildung proinflammatorischer Zytokine in neutrophilen Granulozyten verhindern (Lubetsky et al., 2002). Es inhibiert zusätzlich die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung von Makrophagen (Al-Abed et al., 2005). Insgesamt besitzt Iso-1 somit einen anti-inflammatorischen Effekt.

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität von MIF zu hemmen besteht darin, die Bindung an den MIF-Rezeptor-Komplex zu blockieren. Ein möglicher Rezeptor für MIF ist das Oberflächenantigen CD74, ein Typ II Transmembranprotein. CD74 ist unter anderem auf der Zellmembran von Makrophagen lokalisiert und ist bekannt als invariante Kette des MHC-Klasse-II-Komplexes (Takahashi et al., 2009). Studien zeigten, dass MIF über Aktivierung von CD74 auf Makrophagen die Freisetzung von Makrophagen-inflammatorischem-Protein-2 (MIP-2) und Keratinozyten-abgeleitetem-Chemokin (KC) initiiert. Diese Zytokine führen unter anderem zur Akkumulation von Granulozyten. Dieser Vorgang wird durch Blockierung von CD74 auf den Makrophagen unterdrückt (Takahashi et al., 2009).

In einer Vergleichsstudie, die Iso-1 und anti-CD74-Antikörper zwecks MIF-Inhibierung untersuchte, wurde gezeigt, dass Iso-1 die Granulozytenzahl stärker senkte als die Blockierung von CD74 (Takahashi et al., 2009). In diesem Zusammenhang gilt jedoch zu beachten, dass CD74 nicht von Granulozyten exprimiert wird (Bernhagen et al., 2007). Somit handelt es sich bei jedem Einfluss, der durch CD74-Blockierung auf die Funktion von Granulozyten zustande kommt um einen indirekten Effekt, der durch Makrophagen oder anderer CD74-positive Zellen vermittelt ist. Außerdem ist belegt, dass IL-8 zu einer Erhöhung der CD74-Expression führt (Beswick et al., 2005). Im proinflammatorischen Milieu sollten deswegen für eine Neutralisation von CD74 zusätzlich Antikörper gegen IL-8 verwendet werden (Beswick et al., 2005). Durch die Blockade von IL-8 jedoch könnten die Granulozyten beeinflusst werden und es wäre schwer die vorliegenden Wirkungen von einer Blockade von MIF abzugrenzen.

Da in der vorliegenden Dissertation MIF unabhängig vom CD74 Status der verwendeten Zellen gehemmt werden sollte, wäre CD74 zur Blockierung von MIF ungeeignet gewesen.

Eine andere Möglichkeit die Aktivität von MIF zu hemmen ist der Einsatz von anti-MIF-Antikörpern (He et al., 2009). Die biologische Aktivität von MIF wird einerseits durch klassisch extrazelluläre Bindung an einen membrangebundenen Rezeptor, aber auch durch einen endogenen Signalweg nach Endozytose vermittelt (Calandra und Roger, 2003). Antikörper gegen MIF haben den Nachteil, dass nur extrazelluläres MIF gebunden wird. Das heißt, dass nach Aufnahme von MIF in die Zelle der neutralisierende Antikörper nicht mehr die Möglichkeit besitzt MIF zu erreichen und zu blockieren. Weitere Nachteile bestehen darin, dass MIF inhibierende Antikörper nur bei relativ kurzen Zellkulturexperimenten geeignet sind und diese oft unspezifische Effekte über den Fc-Teil bei Experimenten mit Fc-Rezeptor positiven Zellen wie Granulozyten ausüben. Aus den genannten Gründen stellt der Einsatz von anti-MIF-Antikörper keinen optimalen Lösungsansatz dar.

Eine weitere Klasse von MIF-Inhibitoren sind von p-Hydroxyphenylimin abgeleitete Aminosäuren, die ein Dopachrom- und p-Phenylpyrovatgerüst besitzen. Die L-Tryptophan-Schiff'sche Base stellt eine der potentesten Inhibitoren der MIF-Tautomerase-Aktivität (Al-Abed et al., 2005) dar. Leider verfügt die L-Tryptophan-Schiff'sche Base über keine ausreichend dauerhafte Stabilität und ist somit für die Zellkulturanwendung ungeeignet.

Der P450-abhängige Metabolit des Paracetamols, N-acetyl-p-benzoquinonimin (NAPQI), besitzt ebenfalls die Möglichkeit an das katalytische Zentrum des MIF zu binden. Jedoch ist NAPQI aufgrund seines toxischen Profils nicht bei zellulären *in vitro* Experimenten anwendbar (Al-Abed et al., 2005).

Aus den genannten Gründen ist der Einsatz von Iso-1 für die vorliegenden Versuche am besten geeignet.

### 6.1.2. Rhodamin-123 als Nachweis für reaktive Sauerstoff-Intermediate

Beim Kontakt eines neutrophilen Granulozyten mit Pathogenen wird die Aktivierung des Granulozyten eingeleitet. Mit Hilfe der NADPH-Oxidase wird aus Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoff ( $O_2$ ) das Hyperoxidanion ( $O_2^-$ ) generiert (Vowells et al., 1995). Das hochreaktive Hyperoxidanion ist das Ausgangsprodukt für die Synthese einer Reihe weiterer reaktiver Sauerstoff-Intermediate. Beispielsweise bildet sich das stabilere Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) durch eine von der Superoxid-Dismutase katalysierte Disproportionierung. Als wasserähnliches und neutrales Molekül kann Wasserstoffperoxid

leicht in Zellen eindringen. Aus Wasserstoffperoxid und Chlorid-Ionen kann durch die Myeloperoxidase das hochreaktive Hypochloridanion ( $\text{OCl}^-$ ) gebildet werden (Gross et al., 2009). Eine wirksame Methode zur Messung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist die Oxidation von Dihydrorhodamin-123 (DHR-123) zum rot fluoreszierenden Rhodamin-123 (RH-123) (Rothe et al., 1988). In vergangenen Studien wurde ein weiterer Kandidat, 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCFH-DH), zur Detektion von ROI in Tumorzellen untersucht (Qin et al., 2008). In Tumorzellen haben ROI ihren Ursprung in Mitochondrien (Lu et al., 2006). Zur Vergleichsmessung der Spezifität hat man eine Doppelfärbung der Zellen mit den oben erwähnten Detektoren für  $\text{H}_2\text{O}_2$  sowie einer Mitochondrienfärbung namens CM-H2TMRos durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass DCFH-DH die Mitochondrien und das Zytoplasma gleich stark anfärbt (Qin et al., 2008). Beim Einsatz von DHR-123 konnte man jedoch eine perfekte Überlagerung der RH-123-Fluoreszenz und den Mitochondrienbezirken feststellen (Qin et al., 2008). DHR-123 kann aus diesem Grund als Marker mit hoher Spezifität für ROI beschrieben werden.

Natriumazid, ein Gift der Myeloperoxidase, erhöht die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in der Zelle, so dass den Detektoren DHR-123 und DCFH-DH mehr Reduktionsäquivalente zur Verfügung stehen (Vowells et al., 1995). Der Einsatz von Natriumazid erhöht jedoch nicht die Gesamtfluoreszenzintensität von DCFH-DH (Vowells et al., 1995). Daraus kann man schließen, dass DCFH-DH insgesamt weniger sensitiv auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert als DHR-123. DHR-123 zeichnet sich dadurch als Marker mit hoher Sensitivität für ROI aus.

Die Reduktion von Cytochrom c wurde in früheren Studien zur Detektion von ROI getestet (Caldefie-Chézet et al., 2002). In einer Vergleichsstudie, die das kinetische Profil der Cytochrom c-Reduktion mit RH-123-Produktion testet, stellte sich heraus, dass das Ausmaß der Antwort bei DHR-123-Einsatz höher ist (Freitas et al., 2009). Ein Grund dafür ist, dass das Cytochrom c ohne Lyse nur extrazellulär und RH-123 intra- und extrazellulär gemessen werden kann.

Aus den vorliegenden Gründen erscheint der Einsatz von DHR-123 zur Detektion von ROI für die vorliegenden Versuche am geeignetsten.

### 6.1.3 Zymographie als Nachweismethode für Matrix-Metalloproteaseaktivität

Matrixmetalloproteasen (MMP) bilden eine Enzymfamilie, denen die Fähigkeit gemein ist als zinkbindende Endopeptidasen jegliche Bestandteile der extrazellulären Matrix auflösen zu können (Werner et al., 2001). Physiologisch sind sie bei Gefäßneubildung, Wundheilung,

Erweiterung des Muttermundes oder Brustdrüsenrückbildung von großer Bedeutung. Ein Überschuss von MMP kann jedoch verschiedene Erkrankungen wie Arthritis, Multiple Sklerose, Leberzirrhose, Arteriosklerose oder Tumorentstehung und -progression zur Folge haben (Cheng et al., 2008). Wie alle Proteasen wird die Aktivität der MMP auf verschiedenen Ebenen kontrolliert, da eine vorzeitige Aktivierung für die Zellen fatale Folgen haben könnte (Werner et al., 2001). Die Aktivität kann kontrolliert werden auf Genexpressionsebene durch Transkription und Translation, spezifische Inaktivierung durch endogene Gewebeinhibitoren (TIMPs) oder durch Synthese von Proenzymen, wie beispielsweise MT-MMP, welches erst in eine aktive Form überführt werden muss (Werner et al., 2001).

Zur Detektion von MMP-9 und MMP-2 kann man die Eigenschaft dieser Proteasen nutzen, Gelatine abzubauen. Als Nachweismethode bietet sich die Gelatine-Zymographie an, da sie eine einfache, hochempfindliche und spezifische Technik für die Bestimmung von Gelatinaseaktivität (Quesada et al., 1996) darstellt. Selbst kleinste Mengen an MMP in den zu untersuchenden Proben können damit detektiert werden.

Nach Durchwanderung der Proben in das Gelatine enthaltende Gel, wird das SDS durch Triton X-100 entfernt und erlaubt somit den Gelatinasen sich im Gel zu renaturieren und zu autoaktivieren. Nach Coomassieblau-Färbung erscheinen die Regionen weiß, in denen durch starke Aktivität der Gelatinasen das Substrat abgebaut wurde. Die Gelatine-Zymographie bietet also die Möglichkeit die Gelatinaseaktivität zu visualisieren. Diese Reaktion ist hochspezifisch, da sie Gelatinasen vorbehalten ist. Aufgrund der leichten Durchführbarkeit, ihrer hohen Sensitivität und nicht zuletzt wegen der langen Haltbarkeit des Gels ist die Gelatine-Zymographie für die vorliegenden Versuche eine ausgezeichnete Möglichkeit die MMP-Aktivität zu bestimmen. Ein weiterer Vorteil ist die Tatsache, dass die beiden Gelatinasen MMP-9 und MMP-2 aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Masse in verschiedene Banden aufgetrennt werden, sodass man sie differenziert betrachten kann.

Eine alternative, einfache und kostengünstige Art MMP-Aktivität nachzuweisen, ist der Einsatz von FITC gebundener Gelatine. Die Fluoreszenz interner FITC-markierter Gelatine ist kaum messbar, so dass bei einer Wellenlänge von 495 bis 525 nm nur ein schwaches Signal nachweisbar ist. Erst durch Umsetzung der Gelatine durch MMP-9 wird FITC freigesetzt und kann detektiert werden (Cheng et al., 2008). Für MMP-9 hat sich jedoch herausgestellt, dass diese Methode im Vergleich zur Zymographie eine geringere Sensitivität aufweist. Ein weiterer Nachteil ist der große Zeitaufwand der investiert werden muss, um den gebundenen von den nicht gebundenen Markern zu trennen. Für die vorliegenden Versuche wurde deshalb diese Methode nicht in Erwägung gezogen.

Bei einer weiteren Detektionsmethode von MMP-9 wird die Gelatine mit einem Radioisotop ( $^{14}\text{C}$  oder  $^3\text{H}$ ) markiert, in den MMP-9-Proben inkubiert und die freigesetzten Isotope in einem Flüssigszintillationszähler gemessen. Diese Methode hat den Nachteil, dass teure Geräte benötigt werden, um die Isotope zu bearbeiten bzw. um die freigesetzten Marker zu registrieren. Außerdem entsteht durch den radioaktiven Müll ein Beseitigungsproblem (Cheng et al., 2008). Aus diesem Grunde kann diese Methode nicht mit der einfachen Handhabung der Zymographie konkurrieren.

Eine weitere Methode MMP-9-Aktivität zu messen ist die Verwendung von biotinylierter Gelatine. Dazu wird eine Mikrotiterplatte mit Avidin beschichtet und anschließend ein biotinylierter Marker, welcher an Avidin bindet, dazugegeben. Die Gabe von Gelatinasen bewirkt eine Ablösung von Gelatinefragmenten und dadurch eine proportionale Reduzierung des verbleibenden Biotins. Die Aktivität wird spektrophotometrisch durch Streptavidin-Peroxidase-Bindung ermittelt. Der größte Nachteil dieser Technik ist die fehlende Spezifität. Sie kann nicht zwischen Enzymen wie MMP-9 und MMP-2, die das gleiche Substrat umsetzen, unterscheiden (Cheng et al., 2008). Dies führt zu einer ungenauen Messung mit falsch erhöhten Werten der Enzymaktivitäten.

Es gibt die Möglichkeit MMP-9 mittels Western Blot zu detektieren. MMP-9 besitzt jedoch proteolytische Eigenschaften und kann auch in ihrer inaktiven Form vorliegen. Deswegen erscheint die Bestimmung spezifischer, wenn als Parameter die Aktivität angegeben wird. Der Western Blot ist mit den oben aufgeführten Methoden nicht gut zu vergleichen, da dadurch nicht die Aktivität, sondern ausschließlich die Proteinmenge nachgewiesen werden kann.

Einige der genannten Methoden zur Detektion von MMPs ermöglichen eine bessere absolute Quantifizierung als die Zymographie. Aufgrund eines überschaubaren Versuchsansatzes und deutlicher Unterschiede der verschiedenen Versuchsbedingungen ist jedoch bei den durchgeführten Experimenten eine genauere absolute Quantifizierung nicht erforderlich.

Zusammenfassend lässt sich für die vorliegende Arbeit nach Abwägung aller Vor- und Nachteile folgern, dass alle beschriebenen Methoden der Gelatin-Zymographie unterlegen sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Gelatine-Zymographie hochempfindlich, einfach zu handhaben, kostengünstig und nicht zeitintensiv ist. Sie differenziert gut zwischen MMP-2 und MMP-9 und bringt keine Probleme mit der Entsorgung mit sich. Aus den genannten Gründen stellte die Gelatine-Zymographie für die durchgeführten Experimente die Methode der Wahl dar.

## 6.2. Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1. Expression von MIF im malignen Gewebe

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des MIF-Proteins in Tumorzellen von Kopf- und Halstumorpatienten durch Fluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten untersucht.

In allen analysierten Proben lag eine große Anzahl für MIF und EpCAM doppelt positive Tumorzellen innerhalb der EpCAM positiven Tumorinseln vor. Die Tumorzellen innerhalb der Tumorinseln konnten aufgrund ihres zum Kern verschobenen Kern-Plasma-Verhältnisses unter dem Phasenkontrastmikroskop als entartete Zelle eingestuft werden. In allen Tumorschnitten waren die MIF positiven Zellen meist am Rand der Tumorinseln zu finden. Es scheint, dass die Zellen am Rand der Tumorinseln eine erhöhte MIF-Produktion aufweisen. Gleichzeitig waren jedoch diese Zellen schwächer positiv für den epithelialen Marker EpCAM als die Zellen im Inneren der Tumorinsel. Es scheint, dass diese Tumorzellen ihren epithelialen Ursprung verlieren, was einer Entdifferenzierung entspricht.

Diese schwach EpCAM-exprimierenden und stark MIF-produzierenden Zellen am Rand der Tumorinsel bilden eine invasive Front, wie im Phasenkontrast der Gefrierschnitte zu erkennen ist. Man kann spekulieren, dass die erhöhte MIF-Sekretion die Funktion angelockter Granulozyten modifiziert, welche im Umkehrschluss die Metastasierung des Tumors begünstigen könnten.

Die für die *in vitro* Experimente verwendete Zelllinie FaDu wurde auf ihre MIF exprimierenden und sezernierenden Eigenschaften hin charakterisiert. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die zytosolische Lokalisation in den FaDu-Zellen visualisiert werden. Eine zeitabhängige Sekretion von MIF in den Kulturüberstand wurde mittels ELISA nachgewiesen. Der FaDu-Kulturüberstand, der für die Stimulation der Granulozyten verwendet wurde, enthielt nach 24 Stunden somit eine definierte Menge an MIF. Es zeigte sich, dass FaDu-Kulturüberstand mit 2 ng/ml MIF eine ausreichend hohe Konzentration beinhaltet, um damit in unterschiedlichen Experimenten die Einflüsse von MIF auf die Funktion von Granulozyten untersuchen zu können.

Es ist beschrieben, dass die MIF-Expression in physiologischen Prozessen, wie der Embryogenese eine Rolle spielt (Kobayashi et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass MIF durch Kontrolle der Zellproliferation bei der Entwicklung verschiedener Gewebe involviert ist. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass eine Überexpression von MIF in verschiedensten Tumoren epithelialen Ursprungs zu Tumorprogression und metastasierendem Potential führt. Beim Ösophaguskarzinom zeigt sich eine Überexpression von MIF, die mit hohem Tumorgrad, hoher Mikrogefäßdichte und positivem Wächterlymphknotenbefall korreliert

(Ren et al., 2005). Weiterhin zeigte sich bei Frauen mit Brustkrebs eine erhöhtes Vorkommen von MIF im Tumor (Verjans et al., 2009). Das Adenokarzinom des Dickdarms ist ebenfalls durch ein gesteigertes MIF-Expressionslevel charakterisiert. (Legendre et al., 2003). Auch sind beim malignen Eierstocktumor hohe Konzentrationen von aktivem MIF im Tumor selbst und im Aszitespunktat gefunden worden (Hagemann et al., 2007). In immunhistochemischen Doppelfärbungen von Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereichs konnte durch die vorliegende Arbeit erstmalig eine Expression von MIF in EpCAM positiven Tumorzellen nachgewiesen werden.

Die Bedeutung von MIF bei der Tumorentstehung und -progression wird vor allem bei der Neubildung von Gefäßen deutlich. Es wurde bereits gezeigt, dass exogenes MIF eine indirekte angiogenetische Aktivität auf Endothelzellen durch verstärkte Ausschüttung des vaskulär endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) besitzt (Sun et al., 2003). Eine direkte angiogenetische Aktivität auf Endothelzellen scheint durch den Signalweg der mitogen-aktivierten Proteinkinase und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) vermittelt zu werden (Amin et al., 2003).

In Krebszellen kommt es in schrittweiser Entwicklung zur Häufung von Fehlern in der Regulation von Zellproliferation und Homöostase. Für die Tumorgenese gibt es mehrere Möglichkeiten. Ein Karzinom entsteht zum einen sporadisch, dass heißt ohne äußere Einflüsse. Dabei mutieren bestimmte Gene und führen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen (Hanahan und Weinberg, 2000).

Ein anderer Mechanismus der Tumorentwicklung führt über äußere chemisch und physikalisch einwirkende Noxen (Karzinogene), sowie durch bestimmte Viren zu Proteinwechselwirkungen und DNA-Interferenzen und damit zur malignen Entartung (Wogan et al., 2004; Gatz et al., 2005).

Ein weiterer und bis dato in der Wissenschaft wenig diskutierter Weg der Tumorentstehung geht davon aus, dass eine persistierende chronisch-inflammatorische Entzündung zur Tumorentstehung und -progression führt. Dieser funktionelle Zusammenhang ist zwar schon 1863 von Virchow beschrieben worden, wurde aber erst wieder in den letzten Jahren aufgegriffen (Balkwill und Mantovani, 2001). Als Beispiel dafür kann die Assoziation von *Helicobacter pylori*-Infektion mit dem Magenkarzinom genannt werden. Eine wichtige Rolle bei Tumorentstehung spielen hierbei infiltrierende Leukozyten. Diese produzieren eine große Anzahl von Mediatoren unter anderem ROI, die sich normalerweise gegen eine Infektion richten sollen. ROI jedoch führen auch zur Gewebeschädigung und zu bleibenden

genomischen Veränderungen in proliferierenden Zellen (Coussens und Werb, 2002). Der obere Aerodigestivtrakt ist kontinuierlich Pathogenen wie humanen Papillomviren (HPV) und toxischen Reizstoffen wie Nikotin und Alkohol ausgesetzt. Diese fördern die Entstehung von entzündlichen Prozessen und beeinflussen letztendlich entscheidend die Bildung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich (Argiris et al., 2008). Die vorliegende Arbeit sollte den Einfluss von tumoralem MIF auf die Funktion von Granulozyten herausarbeiten und somit einen möglichen Erklärungsansatz für die resultierende maligne Transformation von Zellen liefern.

Zusammenfassend häufen sich immer mehr Hinweise, dass MIF durch seine einzigartigen biologischen Aktivitäten, insbesondere bei der Regulation von Tumorsuppressorgenen, Onkogenen, Angiogenese und Zellproliferation ein wichtiges Bindeglied zwischen chronischer Entzündung und der Entstehung von Krebs darstellt (Bucala und Donnelly, 2007).

### 6.2.2. Rolle von MIF bei der Apoptose

Entstehung und Fortschreiten unterschiedlicher Erkrankungen wie auch Neoplasien enthalten Störungen apoptotischer Prozesse. Eine mögliche Erklärung für die durch MIF geförderte maligne Entartung konnte durch Versuche mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) gefunden werden. Hierbei zeigte sich, dass MIF in MEFs die Genexpression des Tumorsuppressorgens p53 inaktiviert und somit die MEFs vor der Apoptose bewahrt werden (Petrenko et al., 2003). MIF wirkt nicht nur auf Stromazellen, sondern auch auf Tumorzellen antiapoptotisch, wie es beim dukalen Adenokarzinom des Pankreas gezeigt wurde (Denz et al., 2010).

In den Experimenten der vorliegenden Dissertation wurde bereits beschrieben, dass FaDu-Zellen MIF produzieren. Allerdings wurde für die durchgeführten Versuche nicht das sezernierte MIF aus dem FaDu-Kulturüberstand isoliert. Es ist zu berücksichtigen, dass der FaDu-Kulturüberstand ein Gemisch verschiedenster Mediatoren, die regulatorisch auf umgebende Zellen wirken, darstellt. Epitheliale Tumoren können neben MIF auch andere biologisch aktive Moleküle wie Hormone, Prostaglandine, Stickstoffmonoxid, Neuropeptide, Ganglioside, Zytokine, Chemokine oder Wachstumsfaktoren ausschütten (Shurin et al., 2006). Die vorliegende Arbeit beschreibt die Modulation des Effekts von MIF zusammen mit anderen Mediatoren auf die Apoptose von Granulozyten. Proinflammatorische Zytokine wie IL-8 und IL-6, der Lipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und der Wachstumsfaktor Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (G-CSF) werden aufgrund ihrer Fähigkeit die



Funktion der Granulozyten zu modulieren im Folgenden näher besprochen. Sie zeichnen sich alle durch eine antiapoptotische Wirkung auf Granulozyten aus.

IL-8, ein proinflammatorisches Zytokin, wird physiologisch von Fibroblasten und Monozyten, pathologisch von Kopf- und Halstumorzellen produziert. Von Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes sekretiertes IL-8 fördert die Chemotaxis von Leukozyten und regt die Gefäßneubildung an (Verbeke et al., 2010). Rekrutierte Granulozyten fungieren hier jedoch als zweischneidiges Schwert: Sie remodelieren die extrazelluläre Matrix und erlauben somit sich selbst und anderen Immunzellen in das involvierte Gewebe einzuwandern. Andererseits erhöhen sie dadurch aktiv die Mobilität von Tumorzellen (De Larco et al., 2004). Eine andere wichtige Eigenschaft des IL-8 ist es die spontane Apoptose von Granulozyten zu hemmen (Kettritz et al., 1998). In der vorliegenden Dissertation wird beschrieben, dass nach Inkubation der Granulozyten im FaDu-Kulturüberstand die Zellen deutlich weniger zur spontanen Apoptose neigen als bei Inkubation in Kontrollmedium. Iso-1 jedoch hemmt in Kombination mit FaDu-Kulturüberstand das Überleben der Zellen lediglich um 15%, was für eine recht geringe Rolle des MIF spricht. Für den gezeigten antiapoptotischen Effekt des FaDu-Kulturüberstandes könnte somit von FaDu-Zellen sekretiertes IL-8 verantwortlich sein. Im Serum von Patienten mit Kopf- und Halstumoren sind höhere Konzentrationen von IL-6 als bei gesunden Patienten nachweisbar (Gallo et al., 1995). IL-6 ist ein wesentlicher Mediator der Akuten-Phase-Reaktion von Entzündungen und Infektionen. Dieses Zytokin fördert die Produktion von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) in Granulozyten und es wurde herausgefunden, dass IL-6 die Apoptose der neutrophilen Granulozyten über den PAF vermittelten Weg hemmt (Biffl et al., 1996). Außerdem fördert IL-6 die granulozytäre Zelladhäsion, einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und eine vermehrte Produktion von ROI in den Granulozyten.

Ein weiterer möglicher antiapoptotischer Effekt geht von S1P aus. Erhöhte S1P-Konzentrationen wurden im Aszitespunktat von Patientinnen mit Ovarialkarzinom nachgewiesen (Wang et al., 2008). Akkumulation von S1P scheint förderliche Effekte auf Entstehung und Metastasierung dieses Tumortyps zu besitzen. S1P ist im Zusammenhang mit der Regulierung der Apoptose von Granulozyten bekannt. Es wurde bereits beschrieben, dass p38, eine mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK), die Apoptose von Granulozyten verhindert. S1P erhöht die aktive Form von p38 MAPK und hemmt die spontane Apoptose der Granulozyten (Chihab et al., 2003).

G-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der von Tumorzellen produziert wird und eine antiapoptotische Wirkung auf Granulozyten besitzt (Wislez et al., 2001). Außerdem regt G-

CSF die Proliferation von determinierten Progenitorzellen und unreifen Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems (Prä-CFU) an und führt zur Ausreifung dieser in Granulozyten. Durch diese Mechanismen wird die Anzahl im Blut zirkulierender Granulozyten erhöht.

Die aktuellen Ergebnisse zeigen, dass die Apoptose von Granulozyten durch viele Faktoren wie IL-8, IL-6, S1P und G-CSF beeinflusst werden kann. Der komplex zusammengesetzte FaDu-Kulturüberstand enthält somit neben MIF noch zahlreiche weitere Komponenten, die das Überleben von Granulozyten beeinflussen.

### 6.2.3. Wirkung von tumoralem MIF auf die Funktion von Immunzellen

Will man den aktuellen Stand der Wissenschaft über die Wirkung von MIF auf Leukozyten wiedergeben, stößt man auf ein facettenreiches Bild. Nahezu alle Leukozyten können durch MIF beeinflusst werden. Bekannt sind Interaktionen von MIF mit T-Lymphozyten und tumorassoziierten Makrophagen (TAMs).

Die Aktivierung von T-Lymphozyten wird durch Zytokine wie IL-2 und IL-15 sowie durch Stimulierung des T-Zell-Rezeptors erreicht. Einerseits werden aktivierte T-Lymphozyten durch von Tumorzellen produziertem MIF zum Teil inhibiert (Yan et al., 2006). Andererseits wird nach Stimulation durch MIF vermehrt IFN- $\gamma$  von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet. (Bacher et al., 1996). IFN- $\gamma$  wiederum kann den Zellzyklus von Granulozyten in der G1-Phase arretieren (Bromberg et al., 1996). Dies liefert eine mögliche Erklärung für den antiapoptotischen Effekt von MIF. Außerdem steigert IFN- $\gamma$  die Proliferation und die zytotoxische Aktivität der CD8-positiven Lymphozyten und die Antikörperproduktion von B-Zellen.

In Bezug auf TAMs zeigte sich, dass diese mit Tumorgrad, -größe und Metastasierung assoziiert sind (Pollard, 2004). MIF hat die Fähigkeit TAMs durch CXCR2-, CXCR4- und CD74-Interaktion zu beeinflussen, sodass sich diese begünstigend auf Tumorwachstum auswirken (Bernhagen et al., 2007). TAMs werden durch MIF außerdem zur Sekretion von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- $\alpha$  und IL-12 angeregt (Calandra et al., 2003).

In der vorliegenden Dissertation ist erstmalig eine Modulation von tumorinfiltrierenden Granulozyten durch von Kopf- und Halstumoren produziertes MIF beschrieben worden.

Granulozyten spielen aufgrund ihrer hohen Anzahl im peripheren Blut eine wichtige Rolle im Immunsystem. Erstaunlicherweise besitzen sie im Kontext von Tumorwachstum und Tumorprogression entgegengerichtete Eigenschaften. Einerseits sind Granulozyten wichtige Effektorzellen, die den Tumor bekämpfen. Andererseits können tumorassoziierte

Granulozyten tumorbegünstigende Faktoren sezernieren, wie z.B. durch Ausschüttung großer Mengen von MMP-9 Schlüsselzellen bei der tumoralen Neoangiogenese (Masson et al., 2005). MMP-9 ist verantwortlich für die Ausschüttung von VEGF, welches förderlich auf die Gefäßbildung wirkt (Riedel et al., 2000). Die Neoangiogenese ermöglicht den Granulozyten schneller und in größerer Anzahl die Tumorumgebung zu erreichen und dort durch Aufnahme ihrer sekretorischen Aktivität begünstigend auf den Tumor zu wirken. Sezerniertes MMP-9 baut, als proteolytisches Enzym von Kollagen IV, die extrazelluläre Matrix und Basalmembran ab und ermöglicht somit den Tumorzellen einerseits umliegendes Gewebe zu infiltrieren und andererseits durch Invasion von Gefäßen zu metastasieren. MMP-9 aus aktivierten Granulozyten wirkt auf die direkte Umgebung und ermöglicht eine erleichterte Adhäsion an Endothelzellen und somit eine beschleunigte Migration durch die Basalmembran (Saalbach et al., 2008). Außerdem spielt das Vorkommen von MMP-9 eine wichtige Rolle in der Remodulierung extrazellulärer Matrix (Mira et al., 2003). Dabei fördert sekretiertes MMP-9 die Angiogenese mehr als konstitutiv aktives MMP-9, welches an der Oberfläche von Tumorzellen gebunden ist. In früheren Studien ist eine positive Rückkopplung zwischen IL-8 und MMP-9 gezeigt worden. IL-8, das von Tumorzellen gebildet wird, löst die Rekrutierung von Granulozyten aus, die MMP-9 ausschütten. MMP-9 setzt IL-8 in eine zehnfach potentere IL-8-Variante um (Opdenakker et al., 2001).

Bei dendritischen Zellen (DC) ist bereits gezeigt worden, dass MMP-9 in der Lage ist durch proteolytische Spaltung von Oberflächen-Rezeptoren die Signaltransduktion der Chemotaxis von DC einzuleiten (Hu und Ivashkiv, 2006). Es ist nicht auszuschließen, dass MMP-9 auch auf Rezeptoren von Granulozyten eine Induktion der Chemotaxis einleitet.

In der ersten Phase der Immunantwort sind Granulozyten die ersten Zellen, die den Ort der Inflammation erreichen. Sie wandern, einem Stimulus wie MIF folgend, durch gezielte chemotaktische Bewegung in inflammatorisches Gewebe ein. Am Ziel angekommen geht die chemotaktische Bewegung, die sich aus Aktin-Myosin Kontraktionen zusammensetzt, in eine ungerichtete chemokinetische Spontanbewegung über. Es wird vermutet, dass der biochemische Mechanismus für die Aktivierung von Chemotaxis und Chemokinesis gleich abläuft (Wikinson, 1991). Die meisten chemischen Lockstoffe binden an sieben-transmembranen-Domäne-Rezeptoren, die durch G-Proteine vermittelt, über Stimulation von Phospholipase C und Proteinkinase C, die zytosolischen Kalziumkonzentrationen erhöhen und somit spontane und gerichtete Migration aktivieren (Niggli, 2003). In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass MIF die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen durch Aktivierung der CXCR2 und CXCR4-Rezeptoren induziert (Bernhagen et al., 2007). Dabei

interagiert der CD74-Rezeptor mit CXCR2 und führt zum Kalziumeinstrom in die Zelle. Da Monozyten und T-Zellen im Gegensatz zu Granulozyten zusätzlich einen CD74 Rezeptor besitzen und dieser für die Signaltransduktion von Bedeutung ist, folgt nach MIF-Stimulation *in vitro* lediglich eine moderate Rekrutierung der Granulozyten im Vergleich zu T-Zellen und Monozyten (Bernhagen et al., 2007).

In das Tumorgewebe eingewanderte Granulozyten werden dort durch tumorales MIF sowie weitere Faktoren im Tumormilieu vor der Apoptose bewahrt und akkumulieren (Baumann et al., 2003). In Anwesenheit von MIF werden die Granulozyten zur sofortigen Sekretion ihrer Granula stimuliert (Swope et al., 1998). Es wurde bereits gezeigt, dass Lactoferrin, welches sich in den Granula der Granulozyten befindet, zur Verzögerung der Apoptose bei Granulozyten führt und die Neutrophilenadhäsion an Gefäßen fördert (Wong et al., 2009). Sowohl das verlängerte Überleben als auch die verstärkte Einwanderung erhöhen die Zahl der Granulozyten im Tumorgewebe. Mit Hilfe seines eisenbindenden Glykoproteins ist Lactoferrin in der Lage mit Zielmolekülen und -zellen zu interagieren. So führt die Anwesenheit von Lactoferrin zur Ausschüttung von proinflammatorischen Faktoren wie IL-8 und TNF- $\alpha$  aus Leukozyten (Sorimachi et al., 1997).

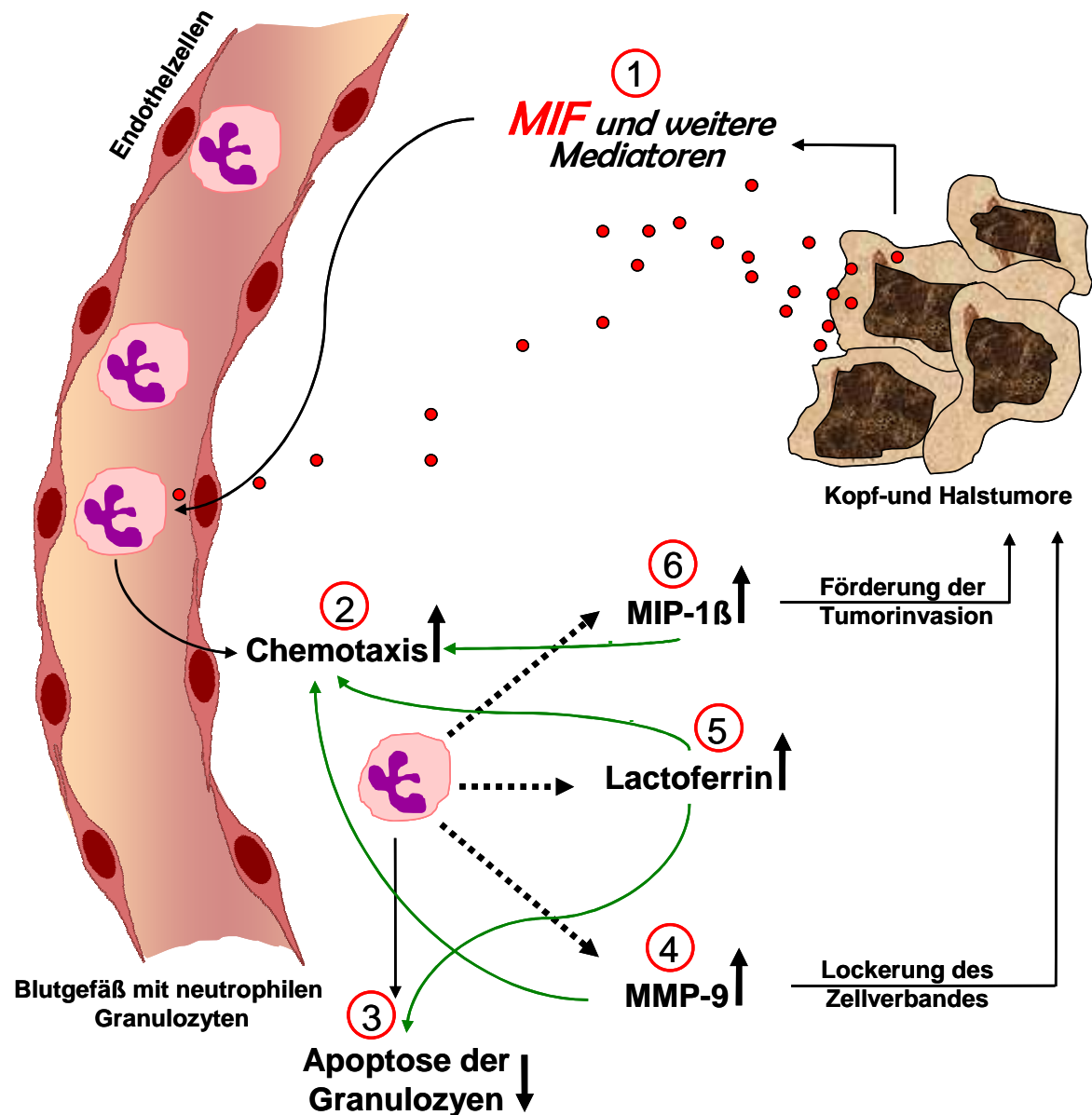
LPS führt in Granulozyten zur Sekretion des proinflammatorischen Chemokins MIP-1 $\beta$  (Smedman et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass tumorales MIF im Vergleich zu bakteriellem LPS eine deutlich stärkere Sekretion von MIP-1 $\beta$  aus Granulozyten bewirkt. In einer Studie zeigten Antikörper gegen MIP-1 $\beta$  bei Prostatakrebspatienten eine deutliche Reduzierung des Rezidiv-Risikos (Blum et al., 2008). Es wurde behauptet, dass Chemokine, die vom Tumor produziert werden, nicht nur anlockend, sondern auch aktivierend auf Leukozyten wirken. Dieser aktivierende Effekt drückt sich in Bezug auf die Ausschüttung von Proteasen, die extrazelluläre Matrix abbauen und somit die Tumordinvasion erleichtern, aus (Opdenakker et al., 2002). Erstmalig konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass MIF durch Beeinflussung der Granulozytenfunktion zu exakt diesen Effekten führt.

Nachfolgende *in vitro* Experimente zu dieser Arbeit sollten aufklären, ob immunmodulatorische Faktoren aus aktivierten Granulozyten tatsächlich ein Feedback-Effekt auf die Tumorzellen besitzen. Hierzu wurde zunächst ein Kulturüberstand aus Granulozyten, welche durch tumorales MIF aktiviert wurden, generiert. Im nächsten Schritt wurden FaDu-Zellen in diesem Überstand inkubiert. Dabei zeigte sich, dass der Granulozyten-Kulturüberstand die Fähigkeit besitzt die Migration und die Kollagenadhäsion von FaDu-Zellen zu steigern (Dumitru et al., 2011). Dadurch konnte schlüssig nachgewiesen werden,

dass die Infiltration von Kopf- und Halstumoren in der Tat einen MIF-abhängigen Einfluss aufweist, wodurch Metastasierung begünstigt werden kann. Ein deutlicher Regelkreis zwischen tumoralem MIF, den Granulozyten und den Tumorzellen selbst konnte somit beschrieben werden.

Mit Identifizierung dieses Feedback-Mechanismus steigt die Bedeutung der in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse bezüglich der Aktivierung von Granulozyten durch tumorales MIF.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von Kopf- und Halstumoren ausgeschüttetes MIF die Funktion von Granulozyten moduliert, indem es Granulozyten anlockt, deren Überleben verlängert und die Produktion proinflammatorischer Zytokine fördert, so dass eine günstige Bedingung für Tumordinvasion und Tumordiversion geschaffen und somit ein aggressiverer Tumorzellphänotyp entstehen kann (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Effekte von tumoralem MIF auf Granulozyten und mögliche Feedback-Mechanismen**

- (1) MIF wird von Kopf- und Halstumorzellen exprimiert und ausgeschüttet.
- (2) MIF fördert die zielgerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten und lockt diese in das Tumormilieu.
- (3) MIF und weitere vom Tumor sezernierte Faktoren verlängern das Überleben der neutrophilen Granulozyten im Tumormilieu und bewirken somit eine zusätzliche Akkumulation von Granulozyten und deren sezernierten Faktoren.
- (4) MIF fördert die Sekretion der Gelatinase MMP-9 aus neutrophilen Granulozyten und führt somit zur Lockerung des Zellverbandes. Die Gefäßneubildung und Infiltration von Tumorzellen und Granulozyten in umliegendes Gewebe wird dadurch begünstigt.
- (5) MIF fördert die Ausschüttung von Lactoferrin aus den Granulozyten. Lactoferrin könnte in vivo die Chemotaxis der Granulozyten verstärken und ihre Apoptose verhindern.
- (6) MIF führt zur Ausschüttung des proinflammatorischen und tumorinvasiven Chemokins MIP-1β aus den Granulozyten. Somit könnten Granulozyten ihre eigene Chemotaxis fördern.

#### 6.2.4. Die Rolle der primären Granula von Granulozyten im Tumormilieu

Abhängig vom Zytokinmilieu produzieren aktivierte, infiltrierende Granulozyten tumorale Wachstumsfaktoren, die Tumorwachstum und -progression fördern (Balkwill und Mantovani, 2001). In der ersten Phase dieser Granulozytenaktivierung, dem nicht-oxidativen Weg, werden Matrixmetalloproteasen und Lactoferrin freigesetzt. In der zweiten Phase werden MPO-haltige azurophile Vesikel zur Degranulation gebracht, die somit den oxidativen Weg einleiten und letztendlich zur Bildung von ROI führen (Ganz, 1999). ROI aus Neutrophilen weisen ein direkt gentoxisches Potential auf und können Immunsuppression verursachen (Malmberg et al., 2001). Tumorales MIF jedoch scheint keinen Einfluss auf die Sekretion reaktiver Sauerstoff-Intermediate aus Granulozyten zu besitzen und beeinflusst somit nicht den oxidativen Weg.

Trotzdem darf die Bedeutung des MPO im Tumorgeschehen nicht außer Acht gelassen werden, da bisherige Untersuchungen auf eine wichtige Rolle bei der Tumorbekämpfung schließen lassen. HOCl, welches das Produkt der MPO-Reaktion darstellt, führt selektiv bei Tumorzellen zur Apoptoseinduktion, da nur diese extrazelluläre  $O_2^-$ -Ionen produzieren.  $O_2^-$ -Ionen reagieren dabei mit HOCl zu molekularem Sauerstoff, Chlorid-Anionen und OH-Radikalen. Über die Lipidperoxidation sind OH-Radikale wiederum in der Lage Apoptose zu induzieren (Ivanovas et al., 2002; Bauer, 2002).

Lactoferrin besitzt in diesem Zusammenhang die Fähigkeit die Produktionsrate reaktiver Sauerstoff-Intermediate zu steigern und scheint somit direkt mit den primären Granula der Granulozyten verknüpft zu sein (Gahr et al., 1991). Außerdem wurde beschrieben, dass aus Wasserstoffperoxid mittels MPO produzierte Hypochlorid-Anionen in der Lage sind latente Gelatinasen, wie Pro-MMP-9 und Pro-MMP-2, in ihre aktiven Formen zu überführen (Peppin et al., 1986). Es scheint, dass die Aktivität der verschiedenen Granula durch gegenseitige Wechselwirkungen genau reguliert ist, so dass tumorales MIF als Induktor der Granulaausschüttung in Granulozyten ein zentraler Modulator der gegenseitigen Aktivierung darstellt.

Bei MIF<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde jüngst festgestellt, dass diese eine reduziertere MPO-Aktivität aufwiesen als der Wildtyp (Martin et al., 2009). Ein wichtiger Unterschied zu Zellkultursystemen, in denen lediglich die MIF-Aktivität inhibiert wird, besteht darin, dass die MIF<sup>-/-</sup>-Maus gar kein MIF produziert und somit relativ kleine Effekte sich deutlicher ausprägen könnten. So wird deutlich, dass sich Ergebnisse aus MIF<sup>-/-</sup>-Mäusen schlecht mit

Zellkultursystemen vergleichen lassen. Ein weiterer denkbarer Grund für die nicht übereinstimmenden Ergebnisse könnte sein, dass sich andere Faktoren im FaDu-Kulturüberstand hemmend auf die Ausschüttung von ROI auswirken und damit einen MIF-induzierten Effekt maskieren. Andererseits ließe sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass tumorales MIF durch die Suppression einer verstärkten Sekretion tumorizider ROI aus Granulozyten eine aktive Tumorbekämpfung verhindert und somit einen weiteren Faktor zur Tumorprogression und -metastasierung liefert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle von MIF auf die Sekretion von MPO aus Granulozyten und seine Wirkung auf Tumorzellen noch nicht ausreichend verstanden ist und weiterer Untersuchungen bedarf.

### **6.2.5. Klinische Relevanz der tumoralen MIF-Produktion**

Die Prognose für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnte in den letzten Jahren kaum verbessert werden. Noch immer wird das Outcome des Therapieerfolges vom Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen, lokoregionäre Rezidive und Fernmetastasierung bestimmt (Boscolo-Rizzo et al., 2006). Ziel der gegenwärtigen Wissenschaft ist die Suche nach neuen laborchemischen Parametern, sogenannten Tumormarkern, um eine Einschätzung des klinischen Verlaufs besser beurteilen zu können. Hierbei rückt MIF, welches von Tumorzellen produziert wird, immer mehr in den Vordergrund wissenschaftlicher Untersuchung. MIF ist im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom im Frühstadium signifikant erhöht. Verglichen mit dem etablierten Marker karzinoembryonales Antigen (CEA) besitzt MIF eine höhere Sensitivität, jedoch eine niedrigere Spezifität. Die Detektion von MIF in Kombination mit CEA verbessert beim kolorektalem Karzinom die Diagnostik (Lee et al., 2008).

Bislang steht kein Tumormarker für Kopf- und Halstumore zur Verfügung. So ist zu prüfen, ob ein Einschluss von MIF als diagnostischer Parameter im Serum von Kopf- und Halstumorpatienten die diagnostische Aussagekraft verbessern könnte.

Die HNO-Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Essen konnte zeigen, dass die Expression von MIF im Tumorgewebe von Kopf- und Halstumorpatienten mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern korreliert. Eine hohe Expression von MIF im Tumor sprach hierbei für eine starke Lymphknotenmetastasierung, während eine niedrige MIF-Expression sehr selten mit starker Lymphknotenmetastasierung einherging, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Expression von MIF bei Kopf- und Halstumorpatienten eine direkte Proportionalität zum Tumorentwicklungsstadium aufweist. Außerdem konnte beschrieben



werden, dass Tumorpatienten mit hoher Expression von MIF eine signifikant reduzierte Fünfjahresüberlebensrate gegenüber Tumorpatienten mit niedriger MIF-Expression haben. MIF stellt ein vielseitiges Protein dar, welches nicht umsonst als “most interesting factor” bezeichnet wird (Bucala, 2000). Die vorliegende Arbeit bietet durch die beschriebenen Modulationen von tumoralem MIF auf Granulozyten einen möglichen Mechanismus, der MIF als weiteren funktionellen Parameter tumorfördernder Entzündungsreaktionen bei Kopf- und Halstumoren beschreibt. MIF lockt Granulozyten ins Tumormileu und verlängert in der Tumorumgebung angekommen ihr Überleben. Durch MIF werden Granulozyten zur Sekretion von MMP-9 stimuliert, welches die extrazelluläre Matrix auflockert. Weiterhin führt MIF zur Sekretion von Lactoferrin und MIP-1 $\beta$  aus Granulozyten. Lactoferrin wirkt wiederum antiapoptotisch und ebenfalls als Chemoattraktans für Granulozyten. MIP-1 $\beta$  besitzt ebenfalls chemotaktische Wirkung auf Granulozyten und fördert die Tumordinvasion. Obwohl man bis dato glaubte, dass aktivierte Granulozyten als antitumorale Effektorzellen wirken, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch den Einfluss von MIF auf Granulozyten ihnen eher eine tumorfördernde Rolle zugesprochen werden kann. Daher empfiehlt es sich zur Bestimmung der klinischen Relevanz von tumoralem MIF eine genaue Re-Evaluierung der Rolle von induzierten Granulozyten im Wachstum von Tumoren *in vivo* durchzuführen.

In der Vergangenheit wurde bereits mit Hilfe von niedermolekularen Inhibitoren und Antikörper-basierten Therapeutika intensiv an einer gezielten Hemmung von MIF gearbeitet (Morand et al., 2006). Die Gabe von ISO-1 im murinen Prostatakarzinommodell konnte erfolgreich zu einer Reduktion der Angiogenese und des Tumorwachstums führen (Meyer-Siegler et al., 2006). MIF ist auch bereits als therapeutische Zielstruktur in verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis bekannt (Morand, 2005). Eine pharmakologische Hemmung der MIF-Aktivität und daraus resultierend eine verminderte Infiltration von Granulozyten im Tumorgewebe bei Kopf- und Halstumorpatienten mit hoher MIF-Expression könnte in Zukunft eine weitere Alternative zu etablierten konventionellen Therapien wie Resektion und Radiochemotherapie darstellen. Daher sollte in Erwägung gezogen werden die MIF-Aktivität in Tumorzellen zu Therapie Zwecken zu regulieren. Die durchgeführten *in vitro* Versuche dieser Arbeit geben Anlass eine mögliche klinische Relevanz durch *in vivo* Modelle zu bestätigen.

Hierfür muss geklärt werden, ob ISO-1 *in vivo* ein ausreichend starker Inhibitor von MIF ist und in wirksamer Konzentration ins Zellinnere gelangt. So nimmt in naher Zukunft die Entwicklung neuer potenter Inhibitoren einen besonderen Stellenwert ein, um mit deren Hilfe

die biologische Wirkung und therapeutische Relevanz von MIF weiter entschlüsseln zu können. Letztendlich käme man dadurch dem Ziel der Heilung bisher nahezu unheilbarer Erkrankungen wieder ein kleines Stück näher.

## Zusammenfassung

Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor (MIF) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches an Tumorprogression und -metastasierung beteiligt ist. Während die direkten Effekte von MIF auf Tumorzellen bereits recht gut charakterisiert sind, ist wenig bekannt über die Modulation tumorassoziierter myeloischer Zellen wie neutrophiler Granulozyten. In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage behandelt werden, welchen Einfluss tumorales MIF auf die Funktion neutrophiler Granulozyten ausübt.

Die Expression von MIF wurde *in situ* anhand histologischer Gewebeschnitte von Kopf- und Halstumoren, sowie *in vitro* anhand einer etablierten Kopf- und Halstumorzelllinie gezeigt. Mit Hilfe eines spezifischen MIF-Inhibitors konnte die modulatorische Aktivität von tumoralem MIF auf die Funktion neutrophiler Granulozyten *in vitro* untersucht werden.

Es konnte in einem *in vitro* System erfolgreich gezeigt werden, dass MIF ein potentes Chemoattraktans für Granulozyten darstellt. Auch *in vivo* könnte somit MIF an der Infiltration von Granulozyten in tumorales Gewebe beteiligt sein. Im Tumormilieu verlängert MIF das Überleben der neutrophilen Granulozyten und erhöht die Freisetzung der Gelatinase Matrix-Metalloprotease-9. Diese führt *in vivo* zur Zersetzung und somit zur Auflockerung des Zellverbandes, was die Einwanderung weiterer Granulozyten sowie die Invasion von Tumorzellen erleichtert. Des Weiteren fördert MIF die Freisetzung von Lactoferrin, welches selbst Granulozyten anlockt und die Infiltration dieser myeloiden Immunzellen in Tumoren verstärkt. Außerdem besitzt Lactoferrin antiapoptotische Fähigkeiten und könnte *in vivo* das Überleben neutrophiler Granulozyten zusätzlich verlängern. Zuletzt schütten die durch MIF aktivierten Granulozyten das proinflammatorische Chemokin MIP-1 $\beta$  aus, welches ebenfalls die Chemotaxis weiterer Granulozyten fördert, sowie auch die Tumordinvasion begünstigen kann.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die Beeinflussung der Funktion von neutrophilen Granulozyten durch tumorales MIF bei Kopf- und Halstumoren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Modulation einen zusätzlichen Mechanismus für Tumorentstehung- und progression darstellt.

## Literaturverzeichnis

1. Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, Valster A, Messmer D, Ochani M, Tanovic M, Ochani K, Bacher M, Nicoletti F, Metz C, Pavlov VA, Miller EJ, Tracey KJ. (2005): ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem.* 280, 36541-36544.
2. Altstaedt J, Kirchner H, Rink L. (1996): Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology.* 89, 563-568.
3. Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. (2003): Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res.* 93, 321-329.
4. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. (2008): Head and neck cancer. *Lancet.* 371, 1695-1709.
5. Attardi LD, Lowe SW, Brugarolas J, Jacks T. (1996): Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *15*, 3693-3701.
6. Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel R, Bacher M. (2008): Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology.* 75, 127-133.
7. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. (1996): An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 7849-7854.
8. Bauer G, Signaling and proapoptotic functions of transformed cell-derived reactive oxygen species. (2002): *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66, 41-56.
9. Bae MK, Ahn MY, Jeong JW, Bae MH, Lee YM, Bae SK, Park JW, Kim KR, Kim KW. (2002): Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability. *J Biol Chem.* 277, 9-12.
10. Baldwin DA, Jenny ER, Aisen P. (1984): The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 259, 13391-13394.
11. Balkwill F, Mantovan A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 357, 39-45.
12. Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. (2003): Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J.* 17, 2221-2230.
13. Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. (2001): COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to

- degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.* 20, 1630-1639.
14. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, McColl SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C. (2007): MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 13, 587-596.
  15. Beswick EJ, Das S, Pinchuk IV, Adegboyega P, Suarez G, Yamaoka Y, Reyes VE. (2005): *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production by gastric epithelial cells up-regulates CD74 expression. *J Immunol.* 175, 171-176.
  16. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr. (1996): Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *J Trauma.* 40, 575-579.
  17. Bloom BR, Bennett B. (1966): Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science.* 153, 80-82.
  18. Blum DL, Koyama T, M'Koma AE, Iturregui JM, Martinez-Ferrer M, Uwamariya C, Smith JA Jr, Clark PE, Bhowmick NA. (2008): Chemokine markers predict biochemical recurrence of prostate cancer following prostatectomy. *Clin Cancer Res.* 14, 7790-7797.
  19. Boscolo-Rizzo P, Da Mosto MC, Gava A, Marchiori C. (2006): Cervical lymph node metastases from occult squamous cell carcinoma: analysis of 82 cases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 68, 189-194.
  20. Borregaard N. (1997): Development of neutrophil granule diversity. *Ann N Y Acad Sci.* 832, 62-68.
  21. Borregaard N und Cowland JB. (1997): Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 89, 3503-3521.
  22. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. (1996): Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 7673-7678.
  23. Bucala R. Signal transduction. (2000): A most interesting factor. *Nature.* 408, 146-147.
  24. Bucala R, Donnelly SC. (2007): Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity.* 26, 281-285.
  25. Budarf M, McDonald T, Sellinger B, Kozak C, Graham C, Wistow G. (1997): Localization of the human gene for macrophage migration inhibitory factor (MIF) to chromosome 22q11.2. *Genomics.* 39, 235-236.
  26. Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Thiele M, Schmucker J, Geiger G, Tovar GE, Bernhagen J. (2005): Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Lett.* 579, 1693-

- 1701.
27. Cai H, Harrison DG. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87, 840-844.
  28. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. (1995): MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature.* 377, 68-71.
  29. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, Heumann D, Männel D, Bucala R, Glauser MP. (2000): Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med.* 6, 164-170.
  30. Calandra T, Roger T. (2003): Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 3, 791-800.
  31. Caldefie-Chézet F, Walrand S, Moinard C, Tridon A, Chassagne J, Vasson MP. (2002): Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clin Chim Acta.* 319, 9-17.
  32. Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. (1998): Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against *Escherichia coli* serotype O111. *Infect Immun.* 66, 2434-2440.
  33. Cheng XC, Fang H, Xu WF. (2008): Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 23, 154-167.
  34. Chihab R, Pörn-Ares MI, Alvarado-Kristensson M, Andersson T. (2003): Sphingosine 1-phosphate antagonizes human neutrophil apoptosis via p38 mitogen-activated protein kinase. *Cell Mol Life Sci.* 60, 776-785.
  35. Cordon-Cardo C, Prives C. (1999): At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med.* 190, 1367-1370.
  36. Coussens LM, Werb Z. (2002): Inflammation and cancer. *Nature.* 420, 860-867.
  37. Dairaghi DJ, Franz-Bacon K, Callas E, Cupp J, Schall TJ, Tamraz SA, Boehme SA, Taylor N, Bacon KB. (1998): Macrophage inflammatory protein-1beta induces migration and activation of human thymocytes. *Blood.* 91, 2905-2913.
  38. De la Rosa G, Yang D, Tewary P, Varadhachary A, Oppenheim JJ. (2008): Lactoferrin acts as an alarmin to promote the recruitment and activation of APCs and antigen-specific immune responses. *J Immunol.* 180, 6868-6876.
  39. De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT. (2004): The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin Cancer Res.* 10, 4895-4900.

40. Denz A, Pilarsky C, Muth D, Rückert F, Saeger HD, Grützmann R. (2010): Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Surg Res.* 160, 29-34.
41. Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. (2001): The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood.* 97, 339-345.
42. Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R. (1997): Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med.* 3, 320-323.
43. Dumitru CA, Gholaman H, Trellakis S, Bruderek K, Dominas N, Gu X, Bankfalvi A, Whiteside TL, Lang S, Brandau S. (2011): Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor modulates the biology of head and neck cancer cells via neutrophil functions activation. *Int J Cancer.* 129, 859-869.
44. Freitas M, Porto G, Lima JL, Fernandes E. (2009): Optimization of experimental settings for the analysis of human neutrophils oxidative burst in vitro. *Talanta.* 78, 1476-1483.
45. Gahr M, Speer CP, Damerau B, Sawatzki G. (1991): Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J Leukoc Biol.* 49, 427-433.
46. Gallo O, Gori AM, Attanasio M, Martini F, Giusti B, Brunelli T, Gallina E. (1995): Interleukin-6 and acute-phase proteins in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 252, 159-162.
47. Ganz T. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. (1999): *Proc Assoc Am Physicians.* 111, 390-395.
48. Gatza ML, Chandhasin C, Ducu RI, Marriott SJ. (2005): Impact of transforming viruses on cellular mutagenesis, genome stability, and cellular transformation. *Environ Mol Mutagen.* 45, 304-325.
49. Gregory AD, Houghton AM. (2011): Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res.* 71, 2411-2416.
50. Gross S, Gammon ST, Moss BL, Rauch D, Harding J, Heinecke JW, Ratner L, Piwnica-Worms D. (2009): Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat Med.* 15, 455-461.
51. Hagemann T, Robinson SC, Thompson RG, Charles K, Kulbe H, Balkwill FR. (2007): Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression, and angiogenesis. *Mol Cancer Ther.* 6, 1993-2002.
52. Hanahan D, Weinberg RA. (2000): The hallmarks of cancer. *Cell.* 100, 57-70.
53. Hasegawa H und Fujita S. (2001): Chemokines and lymphocytes: the role of chemokines and their receptors in the immune system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-*

grand). 47, 599-607.

54. He XX, Chen K, Yang J, Li XY, Gan HY, Liu CY, Coleman TR, Al-Abed Y. (2009): Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol Med.* 15, 1-10.
55. Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. (2005): Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 103, 588-598.
56. Hofmann UB, Eggert AA, Blass K, Bröcker EB, Becker JC. (2003): Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res.* 63, 8221-8225.
57. Horuk R. (1998): Chemokines beyond inflammation. *Nature.* 393, 524-525.
58. Hu Y, Ivashkiv LB. (2006): Costimulation of chemokine receptor signaling by matrix metalloproteinase-9 mediates enhanced migration of IFN-alpha dendritic cells. *J Immunol.* 176, 6022-6033.
59. Ivanovas B, Zerweck A, Bauer G. (2002): Selective and non-selective apoptosis induction in transformed and non-transformed fibroblasts by exogenous reactive oxygen and nitrogen species. *Anticancer Res.* 22, 841-856.
60. Karahan N, Güney M, Baspinar S, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. (2007): Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 28, 184-188.
61. Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. (1998): Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int.* 53, 84-91.
62. Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. (2000): Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature.* 408, 211-216.
63. Kobayashi S, Satomura K, Levsky JM, Sreenath T, Wistow GJ, Semba I, Shum L, Slavkin HC, Kulkarni AB. (1999): Expression pattern of macrophage migration inhibitory factor during embryogenesis. *Mech Dev.* 1-2, 153-156.
64. Kruzel ML, Actor JK, Boldogh I, Zimecki M. (2007): Lactoferrin in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw.* 61, 261-267.
65. Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim HS, Min BS, Kim NK, Kim H. (2008): Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 129, 772-779.
66. Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, Hendlisz A, Schüring MP, Salmon I, Gabius HJ, Pector JC, Kiss R. (2003): Prognostic values of galectin-3 and the



- macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod Pathol.* 16, 491-504.
67. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. (2003): MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med.* 197, 1467-1476.
  68. Lin WW, Karin M. (2007): A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 117, 1175-1183.
  69. Lu M, Gong X, Lu Y, Guo J, Wang C, Pan Y. (2006): Molecular cloning and functional characterization of a cell-permeable superoxide dismutase targeted to lung adenocarcinoma cells. Inhibition cell proliferation through the Akt/p27kip1 pathway. *J Biol Chem.* 281, 13620-13627.
  70. Lubetsky JB, Dios A, Han J, Aljabari B, Ruzsicska B, Mitchell R, Lolis E, Al-Abed Y. (2002): The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem.* 277, 24976-24982.
  71. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. (2002): Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect.* 4, 449-460.
  72. Malmberg KJ, Arulampalam V, Ichihara F, Petersson M, Seki K, Andersson T, Lenkei R, Masucci G, Pettersson S, Kiessling R. (2001): Inhibition of activated/memory (CD45RO(+)) T-cells by oxidative stress associated with block of NF-kappaB activation. *J Immunol.* 67, 2595-2601.
  73. Martin J, Duncan FJ, Keiser T, Shin S, Kusewitt DF, Oberyszyn T, Satoskar AR, VanBuskirk AM. (2009): Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a critical role in pathogenesis of ultraviolet-B (UVB) -induced nonmelanoma skin cancer (NMSC). *FASEB J.* 23, 720-730.
  74. Masson V, de la Ballina LR, Munaut C, Wielockx B, Jost M, Maillard C, Blacher S, Bajou K, Itoh T, Itohara S, Werb Z, Libert C, Foidart JM, Noël A. (2005): Contribution of host MMP-2 and MMP-9 to promote tumor vascularization and invasion of malignant keratinocytes. *FASEB J.* 19, 234-236.
  75. Meyer-Siegler KL, Bellino MA, Tannenbaum M. (2002): Macrophage migration inhibitory factor evaluation compared with prostate specific antigen as a biomarker in patients with prostate carcinoma. *Cancer.* 94, 1449-1456.
  76. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL. (2006): Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol.* 177, 8730-8739.
  77. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. (2002): Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate

- immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 345-350.
78. Mitchell RA, Bucala R. (2000): Tumor growth-promoting properties of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Semin Cancer Biol.* 10, 359-366
  79. Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. (1999): Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J Immunol.* 162, 1120-1126.
  80. Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. (1995): P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol.* 128, 661-671.
  81. Morand EF. (2005): New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J.* 35, 419-426.
  82. Morand EF, Leech M, Bernhagen J. (2006): MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov.* 5, 399-410
  83. Murav'ev RA, Fomina VA, Rogovin VV. (2003): Gelatinase granules of the neutrophil granulocytes. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 4, 389-394.
  84. Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR, Badley RA. (2000): Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods.* 42, 97-114.
  85. Niggli V. (2003): Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 35, 1619-1638.
  86. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. (2006): Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 12493-12498.
  87. Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. (2001): Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.* 69, 851-859.
  88. Opdenakker G, Van Damme J. (2002): Chemokines and proteinases in autoimmune diseases and cancer. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 64, 105-136.
  89. Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H. (1995): Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med.* 181, 435-440.
  90. Peppin GJ, Weiss SJ. (1986): Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 4322-4326.
  91. Petrenko O, Fingerle-Rowson G, Peng T, Mitchell RA, Metz CN. (2003): Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to Ras-mediated transformation. *J Biol Chem.* 278, 11078-11085.

92. Pollard JW. (2004): Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 4, 71-78.
93. Qin Y, Lu M, Gong X. (2008): Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int*. 32, 224-228.
94. Quesada AR, Barbacid MM, Mira E, Fernández-Resa P, Márquez G, Aracil M. (1997): Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clin Exp Metastasis*. 15, 26-32.
95. Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wong J. (2005): Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg*. 242, 55-63.
96. Riechelmann H, Deutschle T, Rozsasi A, Keck T, Polzehl D, Bürner H. (2005): Nasal biomarker profiles in acute and chronic rhinosinusitis. *Clin Exp Allergy*. 35, 1186-1191.
97. Riedel F, Götte K, Schwalb J, Bergler W, Hörmann K. (2000): Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 17, 1099-1105.
98. Rothe G, Oser A, Valet G. (1988): Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften*. 75, 354-355.
99. Rosengren E, Bucala R, Aman P, Jacobsson L, Odh G, Metz CN, Rorsman H. (1996): The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med*. 2, 143-149.
100. Saalbach A, Arnhold J, Lessig J, Simon JC, Anderegg U. (2008): Human Thy-1 induces secretion of matrix metalloproteinase-9 and CXCL8 from human neutrophils. *Eur J Immunol*. 38, 1391-1403.
101. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, Schlöndorff D, Alpers CE. (2000): Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 12, 2231-2242.
102. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. (2006): CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 25, 595-606.
103. Shurin MR, Shurin GV, Lokshin A, Yurkovetsky ZR, Gutkin DW, Chatta G, Zhong H, Han B, Ferris RL. (2006): Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer*

Metastasis Rev. 25, 333-356.

104. Smedman C, Gårdlund B, Nihlmark K, Gille-Johnson P, Andersson J, Paulie S. (2009): ELISpot analysis of LPS-stimulated leukocytes: human granulocytes selectively secrete IL-8, MIP-1beta and TNF-alpha. *J Immunol Methods*. 346, 1-8.
105. Schmidt H, Suci S, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D, von der Maase H, Eggermont AM, Keilholz U. (2007): Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J Clin Oncol*. 25, 1562-1569.
106. Schmielau J, Finn OJ. (2001): Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*. 61, 4756-4760.
107. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li j, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R. (2006): CD44 is the signalling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 25, 595-606.
108. Smith JA. (1994): Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*. 56, 672-686.
109. Sorimachi K, Akimoto K, Hattori Y, Ieiri T, Niwa A. (1997): Activation of macrophages by lactoferrin: secretion of TNF-alpha, IL-8 and NO. *Biochem Mol Biol Int*. 43, 79-87.
110. Sun B, Nishihira J, Suzuki M, Fukushima N, Ishibashi T, Kondo M, Sato Y, Todo S. (2003): Induction of macrophage migration inhibitory factor by lysophosphatidic acid: relevance to tumor growth and angiogenesis. *Int J Mol Med*. 2003; 12, 633-641.
111. Swope M, Sun HW, Blake PR, Lolis E. (1998): Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *EMBO J*. 17, 3534-3541.
112. Takahashi K, Koga K, Linge HM, Zhang Y, Lin X, Metz CN, Al-Abed Y, Ojamaa K, Miller EJ. (2009): Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. *Respir Res*. 10:33.
113. Takase H, Sugita S, Rhee DJ, Imai Y, Taguchi C, Sugamoto Y, Tagawa Y, Nishihira J, Russell P, Mochizuki M. (2002): The presence of macrophage migration inhibitory factor in human trabecular meshwork and its upregulatory effects on the T helper 1 cytokine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43, 2691-2696.
114. Theilgaard-Mönch K, Porse BT, Borregaard N. (2006): Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol*. 18, 54-60.

115. Trellakis S, Bruderek K, Dumitru CA, Gholaman H, Gu X, Bankfalvi A, Scherag A, Hütte J, Dominas N, Lehnerdt GF, Hoffmann TK, Lang S, Brandau S. (2010): Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: Enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. *Int J Cancer*. [Epub ahead of print]
116. Verbeke H, De Hertogh G, Li S, Vandercappellen J, Noppen S, Schutyser E, El-Asarar AA, Opdenakker G, Van Damme J, Geboes K, Struyf S. (2010): Expression of angiostatic platelet factor-4/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer. *Hum Pathol*. 41, 990-1001.
117. Verjans E, Noetzel E, Bektas N, Schütz AK, Lue H, Lennartz B, Hartmann A, Dahl E, Bernhagen J. (2009): Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC Cancer*. 9, 230.
118. Von der Ohe M, Altstaedt J, Gross U, Rink L. (2001): Human neutrophils produce macrophage inhibitory protein-1 $\beta$  but not type I interferons in response to viral stimulation. *J Interferon Cytokine Res*. 21, 241-247.
119. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. (1995): Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods*. 178, 89-97.
120. Wang D, Zhao Z, Caperell-Grant A, Yang G, Mok SC, Liu J, Bigsby RM, Xu Y. (2008): S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells. *Mol Cancer Ther*. 7, 1993-2002.
121. Ward PP, Paz E, Conneely OM. (2005): Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci*. 62, 2540-2548.
122. Weisel KC, Bautz F, Seitz G, Yildirim S, Kanz L, Möhle R. (2009): Modulation of CXC chemokine receptor expression and function in human neutrophils during aging in vitro suggests a role in their clearance from circulation. *Mediators Inflamm*. 790174.
123. Weiss SJ. (1989): Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 320, 365-376.
124. Werner JA, Rathcke IO, Mandic R. (2002): The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Exp Metastasis*. 19, 275-282.
125. Wilkinson PC. (1990): How do leucocytes perceive chemical gradients? *FEMS Microbiol Immunol*. 2, 303-311.
126. Wislez M, Fleury-Feith J, Rabbe N, Moreau J, Cesari D, Milleron B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranet J. (2001): Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating

- factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 159, 1423-1433.
127. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. (2004): Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 14, 473-486.
128. Wong SH, Francis N, Chahal H, Raza K, Salmon M, Scheel-Toellner D, Lord JM. (2009): Lactoferrin is a survival factor for neutrophils in rheumatoid synovial fluid. *Rheumatology (Oxford).* 48, 39-44.
129. Yan X, Orentas RJ, Johnson BD. (2006): Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibits T lymphocyte activation. *Cytokine.* 33, 188-198.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AP-1</b>	Aktivator-Protein-1
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>ARDS</b>	akutes respiratorisches Atemnotsyndrom
<b>cAMP</b>	zyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CCR</b>	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
<b>CD</b>	cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
<b>CEA</b>	karzinoembryonales Antigen
<b>CHMI</b>	5-Carboxymethyl-2-hydroxymukonat-Isomerase
<b>CM</b>	Chrosimat-Mutase
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CSN5</b>	COP9 Signalosom 5
<b>CXCR</b>	CXC-Chemokin-Rezeptor
<b>Cy3</b>	Carbocyanin 3
<b>DC</b>	dendritische Zellen
<b>DCFH-DH</b>	2'7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat
<b>DDT</b>	D-Dopacrom-Tautomerase
<b>DHICA</b>	5,6-Dihydroxyindol-2-Carbonsäure
<b>DHR-123</b>	Dihydrorhodamin-123
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ERK</b>	Extrazellulär signal-regulierte Kinase
<b>G-CSF</b>	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluorescein-5-isothiocyanat
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxie-induzierender Faktor-1 $\alpha$
<b>HOCl</b>	hypochlorige Säure
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>ICAM-1</b>	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
<b>ISO-1</b>	(S,R)-3-(4-Hydroxyphenyl)-4,5-Dihydro-5- Isoxazolessigsäuremethylester
<b>Jab-1</b>	c-Jun aktivierendes Bindungsprotein-1
<b>IFN</b>	Interferon

<b>IL</b>	Interleukin
<b>KC</b>	Keratinozyten-abgeleitetes Chemokin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
<b>MDSC</b>	Suppressorzellen myeloiden Ursprungs
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>MIF</b>	Makrophagen-migrationsinhibierender Faktor
<b>MIF<sup>+/+</sup></b>	MIF Wildtyp
<b>MIF<sup>-/-</sup></b>	MIF Knockout
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Makrophagen inflammatorisches Protein-1 $\beta$
<b>MMPs</b>	Matrixmetalloproteasen
<b>MPO</b>	Myeloperoxidase
<b>NADPH</b>	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphats
<b>NETs</b>	Neutrophil Extracellular Traps
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	nukleäre Faktor-kB-Sequenz
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superoxidradikalanion
<b>OCl<sup>-</sup></b>	Hypochlorid-Anion
<b>4-OT</b>	4-Oxalocrotonat-Tautomerase
<b>PAF</b>	plättchenaktivierender Faktor
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PECAM-1</b>	Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül-1
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3-kinase
<b>PMN</b>	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
<b>Prä-CFU</b>	Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems
<b>rER</b>	raues endoplasmatische Retikulum
<b>ROI</b>	reaktive Sauerstoff-Intermediate
<b>R-123</b>	Rhodamin-123
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>S1P</b>	Sphingosin-1-Phosphat
<b>TAM</b>	tumorassoziierte Makrophagen
<b>TAN</b>	tumorassoziierte Neutrophile
<b>TBS</b>	trishydroxymethyl-aminomethangepufferte Salzlösung



<b>Th 1/2</b>	T-Helferzelle 1/2
<b>TIL</b>	tumorinfiltrierende Lymphozyten
<b>TIMPs</b>	Gewebsinhibitoren von Matrixmetalloproteasen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>Tregs</b>	regulatorische T-Zellen
<b>VEGF</b>	gefäßendothelialer Wachstumsfaktor

# Danksagung

Bei allen, die mir beim Anfertigen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Brandau für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, für die Bereitstellung des Labors, der finanziellen Mittel und für die Bereitschaft zum Diskurs während der Durchführung dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Claudia Dumitru danke ich für die ausführliche Einführung in die experimentellen Techniken und das wissenschaftliche Arbeiten. Im besonderen Maße danke ich ihr für die intensive und engagierte Betreuung, die Unterstützung bei der Durchführung der *in vitro* Versuche, sowie für weitere Anregungen und Denkanstöße.

Ein Dank geht an die technischen Assistentinnen des HNO-Forschungslabores, Kirsten Bruderek und Petra Altenhoff, für die Anfertigung der histologischen Schnitte, technische Unterstützung und die überaus angenehme Atmosphäre im Labor.

Auch allen weiteren Mitarbeitern in Labor und Klinik der HNO ein herzliches Dankeschön für die Beschaffung des Probenmaterials, die freiwilligen Blutspenden und ihre Hilfsbereitschaft.

Und nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und natürlich meiner Freundin Clarissa Wild für die liebevolle Unterstützung und Motivation danken.